

L. ANDERSON

BLOEDAFBRAAK BIJ PASGEBORENEN

J. ENGELHARDT

BLOEDAFBRAAK BIJ PASGEBORENEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE
RIJKS-UNIVERSITEIT TE GRONINGEN OP
GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS
DR. D. VAN OS, HOOGLEERAAR IN DE
FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE,
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACUL-
TEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN
OP WOENSDAG 29 JANUARI 1947, DES
NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

JAN ENGELHARDT

GEBOREN TE WONSERADEEL

DRUKKERIJ GEBROEDERS HOITSEMA - GRONINGEN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Bij de voltooiing van dit proefschrift stel ik er prijs op, U, Hoogleeraren, Oud-Hoogleeraren en Lectoren der Medische en Natuur-Philosophische Faculteiten van de Groningsche Universiteit, te danken voor het onderwijs, dat ik van U mocht ontvangen.

Hooggeleerde VAN LOOKEREN CAMPAGNE, hooggeachte Promotor, deze dank geldt wel U in het bijzonder. Het in dit proefschrift beschreven onderzoek vindt zijn oorsprong in Uw belangstelling voor de physiologie der pasgeborene; dat Gij mij het bewerken van dit onderwerp hebt willen toevertrouwen, stemt mij tot groote dankbaarheid. De vrijheid, die ik bij het onderzoek heb genoten, doch tevens Uw nimmer verflauwende belangstelling en rustige leiding zijn mij een belangrijke steun geweest.

Dat ik daarnaast reeds gedurende zes jaren van Uw veelzijdige ervaring op klinisch gebied heb mogen leeren, is voor mijn vorming tot kinderarts van groote beteekenis.

Hooggeleerde ENGELHARD, mede door Uwe instemming om in Uw Kliniek bij pasgeborenen mijn waarnemingen te verrichten is dit proefschrift tot stand gekomen. Ik betuig U hiervoor mijn hartelijken dank.

Hooggeleerde BRINKMAN, bij mijn onderzoek heb ik een ruim gebruik gemaakt van de, reeds vele jaren geleden, door U gepubliceerde onderzoekingen; dat Gij mij bovendien nog met raad en daad hebt willen bijstaan, is voor mij aanleiding U hartelijk dank te zeggen.

U, assistenten der Paediatrische en Verloskundige Klinieken, zeg ik dank voor Uw daadwerkelijke hulp en zeer gewaardeerde belangstelling.

Veel ben ik verder verschuldigd aan U, zeer geachte Mevrouw Loos en aan U zeer geachte HOEKSEMA voor het verzorgen van het graphische en het experimenteele deel van dit proefschrift.

Tenslotte dank ik alle overigen die mij op eenigerlei wijze behulpzaam zijn geweest.

HOOFDSTUK I.

INLEIDING.

Bij pasgeborenen is het galkleurstoffengehalte van het bloed hooger dan bij volwassenen. Men vindt in het navelstrengbloed dikwijls gehalten van 1—2 mgr. % bilirubine (Ada Hirsch, Cserna en Liebmann).

Gedurende de eerste twee levensdagen neemt de bilirubinaemie nog toe zonder dat er een gele verkleuring van huid of slijmvliezen waargenomen kan worden. Bij een gedeelte der kinderen stijgt het galkleurstoffengehalte gedurende de volgende dagen verder en ontstaat een zichtbare icterus; bij de overigen bereikt de bilirubinaemie niet zóó hoge waarden, dat de icterus zichtbaar wordt. Een zichtbare icterus wordt gevonden bij ongeveer een derde deel der pasgeborenen, doch meer „nauwkeurige” onderzoekingen geven percentages, die varieeren tusschen 20—80%. Deze groote variatie vindt zijn oorzaak in het feit, dat icterus van lichten graad bij pasgeborenen zeer moeilijk is vast te stellen, daar de normale roode huidkleur de gele tint der galkleurstoffen in veel gevallen bedekt. Bovendien is gele verkleuring der sclerae bij pasgeborenen zeker niet het eerst zichtbare teeken van icterus. Van veel beteekenis is een nauwkeurige scheiding der pasgeborenen in een icterische en een niet-icterische groep echter niet. Ook bij de niet-icterische neonati treedt gedurende de eerste levensdagen een vermeerdering der galkleurstoffen in het bloed op in vergelijking met de waarden gevonden in het navelstrengbloed.

Ada Hirsch kon bij pasgeborenen zonder zichtbare icterus een locale huidicterus doen ontstaan, door ter plaatse histamine in de huid te brengen. De vaatuitzetting door histamine heeft een plaatselijke uittreding van plasma-bestanddeelen tengevolge; de eiwitten van dit exsudaat zouden de geadsorbeerde galkleurstoffen meesleepen. Men zou in een dergelijk geval dus kunnen spreken van een latenten icterus neonatorum.

Bij een onderzoek naar de oorzaken dezer postnatale hyperbi-

lirubinaemie dient o.i. dan ook geen onderscheid gemaakt te worden tusschen icterische en niet-icterische pasgeborenen.

De bilirubinaemie kan gedurende de eerste levensweek vrij hoge waarden bereiken. Bij recente onderzoeken vonden Waugh, Merchant en Maughan als gemiddelde hoogste waarden bij niet-icterische neonati 4.2 mgr. % en bij icterische 6.3 mgr. %. Met de door hen gebruikte nauwkeurige methode (volgens Malloy en Evelyn) bleek het bilirubine de indirecte reactie van Hijmans van den Berg te geven, doch in vrijwel alle gevallen, maar in het bijzonder bij de zeer hoge bilirubinegehalten, vonden zij tevens een kleine hoeveelheid direct reageerend bilirubine.

Over de oorzaken, die leiden tot deze post-natale hyperbilirubinaemie, zijn vele onderzoeken verricht en een groot aantal theorieën zijn ter verklaring van dit verschijnsel opgesteld. Een uitvoerig overzicht over deze materie verscheen in 1925 van de hand van van Creveld; geen enkele der in dit overzicht genoemde opvattingen heeft echter stand kunnen houden.

Naderhand zijn nog enkele andere verklaringen voor de post-natale bilirubinestijging gepubliceerd, doch tenslotte zijn ook deze weer verlaten en thans wordt algemeen als juist aangenomen de theorie van Anselmino en Hofman.

Allereerst vroeg men zich af of de bilirubinestijging een gevolg was van een onvoldoende uitscheiding der galkleurstoffen door de lever, dan wel door andere oorzaken optrad. De postnatale hyperbilirubinaemie is o.i. niet overwegend van hepatogenen aard. Hiervoor pleit in de eerste plaats de zeer geringe hoeveelheid direct-reageerend bilirubine in het plasma en in de tweede plaats de groote hoeveelheid bilirubine, die in deze periode met de faeces het lichaam verlaat. Door Ross, Waugh en Malloy werd de bilirubine-uitscheiding van den 3en tot den 8en dag bepaald. Zij vonden bij icterische neonati een gemiddelde dagelijksche excretie van 41.9—63.5 mgr. en bij niet-icterische van 60.8—80.8 mgr. Deze hoeveelheden zijn zóóveel grooter dan die welke op iets ouderen leeftijd gevonden worden (2—6 mgr./24 uur), dat het naar hun meening wel als zeker aangenomen kan worden, dat er gedurende de eerste levensweek een grootere bilirubinevorming plaatsvindt dan op lateren leeftijd. De gevonden verschillen tusschen icterische en niet-icterische pasgeborenen zijn echter statistisch niet significant.

Men heeft ook getracht bij pasgeborenen de leverfunctie te be-

palen. Herlitz maakte hiertoe gebruik van de broomsulfaleïn-proef. Hij vond, dat de lever van pasgeborenen weliswaar niet geheel volwaardig was, doch dat, althans met deze onderzoekingsmethode niet een zoo groote onvolwaardigheid aan te toonen was, dat enkel hierdoor de bilirubine-retentie verklaard zou kunnen worden.

Lin en Eastman voerden de bilirubine-belastingsproef volgens von Bergmann bij een aantal pasgeborenen uit. Zij spoten in de navelvena bilirubine in (3 mgr./K.G. lichaamsgewicht) en bepaalden op verschillende tijdstippen daarna de hoeveelheid bilirubine die nog in het bloed aanwezig was. Het bleek, dat na 2—4 uren alle ingebrachte galkleurstoffen weer uit de bloedbaan verdwenen waren. Zij besloten hieruit, dat de leverfunctie van pasgeborenen zeer goed is.

Uit deze resultaten kan o.i. met zekerheid geconcludeerd worden, dat de hyperbilirubinaemie in het algemeen bij den pasgeborene niet van hepatogenen aard is. Wel is het mogelijk, dat de sterke graden van hyperbilirubinaemie, dus die gevallen waar een duidelijk zichtbare icterus bestaat, door een relatieve leverinsufficiëntie bevorderd worden.

Voor deze opvatting zou aangevoerd kunnen worden de geringere bilirubine-excretie bij kinderen met een zichtbare icterus (41.9—63.5 mgr./24 uur). Rasi en Bianchi vonden echter bij niet-icterische neonati een dagelijksche uitscheiding van 49.8 mgr. bilirubine, tegen bij icterische kinderen 128.6 mgr.

De spreiding der gevonden waarden is echter zeer groot en statistisch zijn de gevonden verschillen niet significant.

Herlitz vond met de broomsulfaleïn-methode geen verschil in leverfunctie tusschen icterische en niet-icterische neonati.

Lin en Eastman daarentegen vonden bij kinderen, die later icterisch werden, een snellere excretie van het ingebrachte bilirubine dan bij hen, die later geen zichtbare icterus vertoonden. Het lijkt ons echter niet geoorloofd uit de door hen gevonden bilirubinegehalten in het bloed zonder meer te besluiten, dat de leverfunctie bij deze groep beter is dan van de niet-icterische groep.

Bij pasgeborenen kan het bilirubine zich gemakkelijk over de weefsels verdeeld hebben, waardoor dus de concentratie in het bloed afgenomen is. Juist neonati, die icterisch worden, blijken dikwijls naar onze indruk een grootere hydrolabiliteit te bezitten, gepaard gaande met een verhoogde doorlaatbaarheid der vaatwanden.

Er is voor pasgeborenen geen scherpe grens voor het galkleur-stoffengehalte van het bloed aan te geven waarboven een zichtbare icterus optreedt. Waarschijnlijk ligt deze bij ± 5 mgr. % (Waugh c.s.), doch er zijn neonati, die reeds bij lagere waarden een zichtbare icterus vertoonen, terwijl daarnaast eveneens gevallen zijn waargenomen van niet-icterische neonati met bilirubine-concentraties in het bloed van meer dan 5 mgr.%. Door Ross c.s. is dan ook verondersteld, dat het zichtbaar worden van de icterus, behalve van het bilirubine-gehalte, tevens afhankelijk is van de bilirubine-affiniteit der weefsels en van de doorlaatbaarheid der vaatwanden.

De algemeene conclusie uit het bovenstaande mag o.i. dan ook zijn, dat de leverfactor bij het ontstaan der postnatale hyperbilirubinaemie niet van groote beteekenis is, doch dat het optreden van dit verschijnsel grootendeels beheerscht wordt door de mate van bilirubinevorming.

Het bilirubine is een afbraakproduct van haemoglobine, dat vrijkomt bij den ondergang van erythrocyten. Het is dus waarschijnlijk, dat in de eerste levensweek een grootere destructie van erythrocyten plaatsvindt dan op lateren leeftijd. De meeste theorieën over de bloedafbraak bij pasgeborenen gaan dan ook uit van het bestaan van een intensieve haemolyse en trachten hiervoor een passende verklaring te geven. De voornaamste voorwaarde, waaraan deze verklaringen dienen te voldoen, is, dat deze voor iederen pasgeborene geldigheid moeten bezitten en dus niet enkel voor een bepaalde groep, die later een zichtbare icterus vertoont.

Men vindt in het navelstrengbloed een hoog Hb-gehalte, een daarmee corresponderend hoog erythrocyten-getal en als teeken van het bestaan van een levendigen aanmaak ook een groot aantal vitaal kleurbare erythrocyten (2—3%) en dikwijls zelfs kernhoudende erythrocyten (tot 500/m.m³).

Deze sterke bloedaanmaak behoeft echter bij den foetus niet vergezeld te gaan van een evenredig verhoogde bloedafbraak, aangezien een deel van de nieuw gevormde erythrocyten noodzakelijk is voor het op peil houden van het Hb-percentages bij een voortdurend toenemend bloedvolume. Hoe groot de bloedafbraak bij den foetus is, is niet bekend. Ylppö is van meening, dat de bilirubine-productie bij den foetus uiterst gering is. Hij grondt dit op het feit, dat hij het bilirubinegehalte van het navelstrengbloed slechts weinig verhoogd vond en op de meening, dat de galkleurstof-uitschei-

ding van den foetus, via de placenta, slechts zeer gering zou zijn, volgens hem niet grooter dan de bilirubine-uitscheiding door de nieren op lateren leeftijd. De galkleurstoffen door de foetale lever naar den darm afgevoerd zijn eveneens gering in hoeveelheid.

Het is moeilijk om deze argumenten te weerleggen, doch het lijkt onwaarschijnlijk, dat pas korten tijd voor de geboorte de bilirubinevorming zou beginnen, omdat naast een zoo sterken bloedaanmaak tijdens de ontwikkeling in utero toch wel eenige bloedaafbraak plaats zal vinden. De levensduur van normale erythrocyten wordt geschat op ± 30 dagen (o.a. Schiødt). De foetale erythrocyten, die zich o.a. van die van volwassenen onderscheiden door hun geringere osmotische resistentie, zullen waarschijnlijk geen langeren, eerder een korteren levensduur bezitten. Ook hierom lijkt het aannemelijk, dat reeds in utero bloedlichaampjes te gronde gaan en bilirubine gevormd wordt. Wel bestaat nog de mogelijkheid, dat een deel der haemoglobine-afbraakproducten bij het gelijktijdig aanwezig zijn van een levendigen bloedaanmaak weer wordt gebruikt bij den opbouw van nieuwe erythrocyten. Heilmeijer en ook Paschkis meenen, dat dit proces inderdaad plaats kan vinden. Bilirubine zelf komt echter niet in aanmerking als bouwsteen voor haemoglobine.

Over de rol, die de placenta speelt bij de uitscheiding van bilirubine is weinig met zekerheid bekend geworden. Ylppö zegt, dat moeders, die tijdens de laatste maanden der graviditeit icterus vertoonen, kinderen ter wereld kunnen brengen, die geen merkbare geelzucht hebben, en dat omgekeerd moeders van kinderen, die duidelijk icterisch geboren worden, zelf geen icterus behoeven te vertoonen. Hieruit trok hij de reeds genoemde conclusie, dat de placenta vrijwel ondoorgankelijk moet zijn voor galkleurstoffen. Het lijkt ons echter zeer goed mogelijk, dat in de placenta de galkleurstoffen niet door diffusie, maar door een actief medewerken der cellen van de foetale naar de moederlijke circulatie worden geleid en dus zelfs van een gebied met een lagere naar één met een hogere concentratie uitgescheiden kunnen worden. In die gevallen, waarin het kind icterisch geboren wordt, is hiervan als regel een overgrootte bloedaafbraak de oorzaak (b.v. icterus gravis neonatorum), waarbij de uitscheidingscapaciteit van de placenta tekortschiet t.o.v. de groote bilirubinevorming. Het is echter geenszins noodzakelijk, dat de moeder in een dergelijk geval een zichtbaren icterus vertoont, daar in de meeste gevallen het van den

foetus afkomstige bilirubine t.o.v. de levercapaciteit der moeder slechts gering in hoeveelheid is. Als steun voor de opvatting, dat de placenta wel galkleurstoffen kan uitscheiden, kunnen nog dienen de onderzoeken van Cserna en Liebmann, die in het navelvene-bloed een bilirubinegehalte vonden, dat 25% lager was dan dat in het navelarteriebloed.

Na de geboorte wijzigt zich de bloedsamenstelling in belangrijke mate: veel onderzoeken zijn verricht over het verloop van haemoglobine- en erythrocyten-waarden gedurende de eerste levensdagen. De verkregen gegevens laten echter geen conclusie toe t.a.v. de intensiteit der postnatale bloedafbraak. In de eerste plaats loopen de resultaten zoover uiteen, dat eenige twijfel over de betrouwbaarheid ervan wel gewettigd schijnt, doch in de tweede plaats beteekent een geringe daling van het Hb-gehalte gedurende de eerste levensdagen nog geenszins, dat de bloedafbraak in deze periode zeer weinig intensief geweest is.

De moeilijkheden bij onderzoeken aan pasgeborenen zijn van velerlei aard. Het verkrijgen van voldoende bloed voor het uitvoeren van de noodzakelijk geachte bepalingen stuit dikwijls op groote moeilijkheden. Als regel is men aangewezen op bloedmonsters verkregen uit den hiel, waarbij een vrij groote kans bestaat, dat dit bloed verdund wordt door weefselvocht, dat bij pasgeborenen rijkelijk aanwezig kan zijn en reeds door lichten druk op den hiel zich met het uitstroomende bloed kan mengen.

Het bloedvolume kan voorts belangrijke wijzigingen ondergaan in de eerste levensdagen. Volgens Lucas en Dearing bedraagt het bloedvolume bij de geboorte $+ 20\%$ van het lichaamsgewicht: gedurende de eerste 10 dagen zou het afnemen tot 11% van het gewicht. Robinow en Hamilton vonden echter een bloedvolume van $+ 10\%$ bij de geboorte, terwijl deze verhouding zich gedurende de eerste tien dagen niet noemenswaard wijzigde.

Indien het circuleerend bloedvolume zich in de eerste dagen zoo sterk wijzigt als Lucas en Dearing gevonden hebben, dan is het wel zeker, dat een gelijkblijvend Hb-gehalte gedurende deze dagen een aanwijzing is, dat een belangrijke hoeveelheid bloed is afgebroken. Indien echter het bloedvolume nauwelijks verandert, dan zou deze zelfde waarneming beteekenen, dat er geen bijzondere wijziging in de verhouding van bloedafbraak en bloedaanmaak was opgetreden.

Om dezelfde reden is het verloop van het galkleurstoffengehalte van het bloed niet een zuivere indicator voor de intensiteit van de bloedafbraak. Ook de galkleurstoffen-uitscheiding is niet als nauwkeurige maat voor de bloedafbraak te gebruiken. Het gaat er immers om, of de bloedafbraak gedurende de eerste dagen sterker wordt dan deze bij de geboorte al was, of, dat de intensiteit van de bloedafbraak geleidelijk minder wordt vergeleken met den toestand bij de geboorte. Voor het vaststellen van dermate fijne nuanceeringen, die in een kort tijdsverloop optreden, is de bepaling van het galkleurstoffengehalte in de faeces niet een voldoende nauwkeurige methode.

Waugh c.s. vonden een vrijwel gelijkblijven van de Hb-waarden van den eersten tot den tienden dag. Ook Faxën vond slechts een matige vermindering gedurende de eerste twee weken. Kraumann en Hoffmann zijn van meening, dat de teruggang van het Hb-gehalte in 10 dagen hoogstens 6—9% bedraagt. Hiernaast zijn er talrijke andere onderzoekers, die mededeelen, dat het Hb-gehalte bij de geboorte hoog wordt gevonden (20—23 gr.%) en dat gedurende de eerste 10 dagen een belangrijke vermindering tot $\pm$ 16 gr.% plaats vindt (Goldbloom en Gottlieb, Lippman).

Misschien kunnen deze groote verschillen echter ten deele verklaard worden door verschillen in de wijze waarop het bloed werd verkregen. De gegevens van Waugh c.s. werden verkregen met behulp van bloed uit de sinus longitudinalis, terwijl de andere onderzoekers als regel werkten met capillair-bloed.

Vahlquist meent, dat de Hb- en erythrocytenwaarden van veneus bloed, gedurende de eerste twee levensweken, lager uitvallen dan in capillair-bloed. Hij is van oordeel, dat dit verschil ontstaat door stasis van erythrocyten in de capillair-gebieden der pasgeborenen, een verschijnsel, dat te vergelijken zou zijn met den toestand van shock. Het gevolg zou kunnen zijn, dat gedurende de eerste vier levensdagen in veneus bloed lagere waarden worden gevonden dan in capillair bloed en dat in de daaropvolgende dagen dit verschil steeds geringer wordt.

Behalve de afbraak van erythrocyten vindt men de eerste dagen na de geboorte eveneens teekenen van een belangrijke nieuwvorming van roode bloedlichaampjes. In het navelstrengbloed zijn in groote hoeveelheid jonge erythrocyten te vinden, die na „vitale” kleuring met brillant-cresyl-blauw een netvormige structuur in het

protoplasma vertoonen; bovendien zijn dikwijls kernhoudende rode cellen te vinden. Kato vond 0.4—1.9 % reticulocyten bij de geboorte; het maximum bedroeg 5.5% gedurende den eersten 1½ dag. Na den vijfden dag daalt het percentage beneden 0.5%. Bij te vroeggeborenen vond hij veel hogere getallen, tot 26.5%. Volgens hem wijst dit erop, dat reeds voor de geboorte de aanmaak van erythrocyten geleidelijk afneemt en dat een betere O₂-voorziening van het beenmerg hierbij geen rol kan spelen.

Het vinden van reticulocyten is echter, strikt genomen, geen bewijs voor het gelijktijdig aanwezig zijn van een actief werkend beenmerg; het is mogelijk, dat de vorming van nieuwe erythrocyten in het merg bij de geboorte reeds geëindigd is en dat de gevonden reticulocyten tot de laatsten behoorden die het beenmerg verlaten hebben. Onderzoekingen van beenmerg-punctaten op geregelde tijdstippen in de eerste levensdagen zijn ons niet bekend geworden.

Kernhoudende erythrocyten kunnen gevonden worden in een hoeveelheid van 400—500 mm³, zonder dat dit pathologische beteekenis behoeft te hebben (Büngler en Schwartz).

Josephs beschouwt het verdwijnen van de bloednieuwvorming als de voornaamste oorzaak voor de daling van het Hb-gehalte na de geboorte. Volgens Schiødt kan inderdaad enkel door het wegvallen van de bloedaanmaak, zelfs bij volwassenen waarbij het aantal reticulocyten $\pm 6 \cdot 10^6$ bedraagt, een dagelijksche afneming van het Hb-gehalte van 3% van het totaal veroorzaakt worden.

Josephs vermeldt niet, dat, naar zijn meening, door het eindigen van de bloedvorming een overschot aan Hb-atbraakproducten ontstaat, met als gevolg een verhoogde bilirubine-uitscheiding.

Vahlquist is een overtuigd aanhanger van de theorie, dat de vermindering van het Hb-percentages bij een pasgeborene enkel verklaard moet worden door een afneming van de bloednieuwvorming. De verhoogde bilirubine-uitscheiding is voor hem geen bewijs van een vermeerderde Hb-atbraak, doch kan ook zijn oorzaak vinden in een verminderde terugresorptie van galkleurstoffen uit den darm; de negatieve directe reactie van Hijmans van den Bergh in het bloedserum, behoeft niet te bewijzen, dat de hyperbilirubinaemie van haemolytischen aard is. Hij besluit dan ook, dat bij den icterus neonatorum de leverfactor een belangrijke rol speelt. De bovengenoemde argumenten van Vahlquist zijn echter eenigszins in strijd met elkaar. Hij neemt aan, dat de verhoogde uitscheiding van gal-

kleurstoffen door een verminderde terugresorptie verklaard kan worden, en anderzijds, dat de leverfunctie niet geheel volwaardig is. d.w.z. niet in staat zal zijn, al het aangeboden bilirubine in korten tijd uit te scheiden. Voor de veranderingen van Hb- en Er.-waarden geeft hij een graphiek, waaruit is af te lezen, dat beide getallen op den 14en levensdag nog liggen boven de waarden, die hij direct bij de geboorte vond. Vahlquist, die tevens met Robinow en Hamilton meent, dat het bloedvolume zich na de geboorte vrijwel niet wijzigt, moet hieruit dus besluiten, hoewel hij het niet uitspreekt, dat na de geboorte de bloedaanmaak zelfs nog geruimen tijd overweegt boven de bloedafbraak.

In een zeer recente publicatie deelt Vandenbroucke mede, dat hij tezamen met Renaer een onderzoek heeft verricht bij een reeks pasgeborenen, waarbij bloedvolume, haematocrietwaarde en erythrocyten-getal gelijktijdig werden bepaald op den 1en en den 8en levensdag. Hun conclusie luidt, dat in het meerendeel der gevallen van icterus neonatorum een duidelijke bloedafbraak voorkomt.

Regelmatige bepalingen van het serumijzergehalte in de eerste levensperiodes zijn o.a. verricht door Renaer en door Vahlquist.

Het serumijzergehalte in het navelstrengbloed is hoog (160—180 mgr.‰). Reeds den eersten dag treedt een sterke daling op (50—90 mgr.‰), terwijl in de daaropvolgende dagen weer een belangrijke stijging is waar te nemen, tot ± 150 mgr.‰.

De plotselinge daling gedurende den eersten dag wordt toegeschreven aan de uitschakeling van de placenta, die een belangrijke ijzerbron is voor den neonatus. Voor de hieropvolgende stijging geeft Vahlquist als verklaring een afneming van de vorming van nieuwe erythrocyten, bij een gelijkblijvende bloedafbraak.

Vandenbroucke acht een vermeerderde bloeddestructie hiervan de oorzaak, daar naar zijn ervaring in gevallen van aplastische anaemie een normaal serumijzergehalte gevonden wordt.

De theorieën, die de verklaring van de postnatale hyperbilirubinaemie zoeken in een versterkte bloedafbraak, behooren te voldoen aan den eisch, dat ze geldig zijn voor alle pasgeborenen, daar niet het bestaan van een zichtbaren icterus doorslaggevend is, doch de hyperbilirubinaemie, die bij alle neonati in deze periode gevonden wordt.

Aan deze voorwaarde voldoet o.a. niet de theorie van Lenart, die de oorzaak van het optreden van icterus neonatorum meende

te vinden, in een verschil in bloedgroep tusschen moeder en kind. Indien de moeder in haar bloed antilichamen tegen de kinderlijke erythrocyten bezit, dan zouden deze via de placenta overgebracht kunnen worden op het kind en aanleiding geven tot haemolyse. Dit zou b.v. het geval zijn, wanneer de moeder bloedgroep A had en het kind groep B; de anti-B agglutinenen van het moederlijke bloed zouden, via de placenta, bij het kind haemolyse kunnen veroorzaken.

Bij gelijke bloedgroep van moeder en kind, zou dus geen icterus neonatorum optreden, evenmin indien de moeder geen agglutinenen bezit (groep AB), of wanneer het kind geen agglutinogenen heeft (groep O). Weliswaar zijn er nog enkele andere bloedgroepen, die mogelijk een rol kunnen spelen, doch deze kenmerken zich over het algemeen hierdoor, dat onder normale omstandigheden de corresponderende antilichamen niet in de circulatie voorkomen.

Martinet en ook Smith hebben de theorie van Lenart bij tal van zuigelingen (ook t.o.v. de bloedgroepen M en N) nagegaan, doch geen verband kunnen vinden tusschen bloedgroepen en icterus neonatorum.

De onderzoekingen van Debré en Hamburger en van Nathan—Larrier c.s. toonden aan, dat z.g. natuurlijke antilichamen, in tegenstelling met verkregen antilichamen, zeer moeilijk de placenta kunnen passeeren.

Behalve het bezwaar van niet algemeen geldig zijn, is ook nog tegen bovengenoemde theorie aan te voeren, dat de uitwisseling van antilichamen in utero zal plaats vinden, terwijl juist de verschijnselen van icterus neonatorum pas eenige dagen na de geboorte optreden. Dezelfde bezwaren zijn ook in te brengen tegen de opvatting, dat een verschil in Rhesus-bloedgroep tusschen moeder en kind de oorzaak zou zijn van den physiologischen icterus neonatorum.

De sensibilisatie van een Rhesus-negatieve moeder door een Rhesus-positieven foetus en daaropvolgenden overgang van de Rhesus-antilichamen via de placenta van moeder op kind is volgens de tegenwoordige opvatting de aetiologie der haemolytische aandoeningen van pasgeborenen (hydrops foetus universalis, icterus gravis neonatorum, anaemia neonatorum). Broman toonde evenwel aan, dat er geen verband tusschen den physiologischen icterus

neonatorum en de Rhesus-bloedgroepen van moeder en kind te vinden was.

Door Anselmino en Hoffmann is de, thans algemeen aangehangen, theorie over de bloedafbraak na de geboorte ontwikkeld. Zij geven weliswaar niet aan hoe de bloedafbraak tot stand komt, doch maken het aannemelijk, dat het voor den pasgeborene gewenscht is, een deel van zijn Hb-voorraad te vernietigen.

Zij vergelijken den pasgeborene met een bergbeklimmer, die van groote hoogte afdaalt in het dal. Volgens hen bevindt de foetus zich in de uterus in een toestand van voortdurend O_2 -gebrek. Hij tracht zich hieraan zoo goed mogelijk aan te passen, door het bloed sneller te laten circuleeren en door het aantal O_2 -dragers, de erythrocyten, sterk in aantal te doen toenemen. Na de geboorte wordt plotseling de O_2 -voorziening zoo veel ruimer, dat er een overschot aan erythrocyten bestaat, die in de eerste levensweek zoo snel mogelijk worden opgeruimd.

Deze theorie, die voor alle pasgeborenen geldigheid bezit, heeft zeer veel aanlokkelijks. De gegevens van Haselhorst en Stromberger, waarop Anselmino en Hoffmann hun theorie baseeren, vermelden inderdaad een lagere O_2 -verzadiging en vooral O_2 -spanning in het bloed van den foetus, vergeleken met het moederlijke bloed. Dat na de geboorte de O_2 -voorziening aanmerkelijk gunstiger wordt, lijdt geen twijfel. Toch zijn er bezwaren tegen deze theorie aan te voeren.

Jonxis formuleerde in 1936 de volgende:

1. Indien de betere O_2 -voorziening na de geboorte de oorzaak is van de daling van het Hb-gehalte, waarom vindt dan een daling plaats beneden de normale waarde van 16 gr.%. Vooral bij vroeggeboorten is dit opvallend, terwijl deze de eerste dagen na de geboorte dikwijls een onvoldoende ontplooiing der longblaasjes en daardoor een geringere O_2 -voorziening blijken te bezitten.

2. Het is geenszins zeker, dat de foetus vóór de geboorte in een toestand van O_2 -gebrek verkeert. Jonge, snel groeiende weefsels hebben slechts een geringe O_2 -behoefte, terwijl bovendien de vrucht voor het constant houden van de lichaamstemperatuur geen zuurstof behoeft te gebruiken.

Wij kunnen hieraan nog toevoegen, dat het in de Groningsche Kinderkliniek enkele malen is waargenomen, dat pasgeborenen met

een ernstig aangeboren hartgebrek en voortdurende cyanose, toch een zichtbaren icterus neonatorum kunnen vertoonen. Ook de onderzoeken van Kramann en Hofmann zijn niet met de O_2 -theorie te rijmen. Zij gingen het verloop van het Hb-gehalte en erythrocyten-getal na bij twee groepen pasgeborenen. Bij de eerste groep werd vóór het afbinden, de navelstreng leeggestreken naar het kind toe en bij de tweede groep werd de navelstreng leeggestreken in de richting van de placenta. Gemiddeld bleek de eerste groep in totaal 105 gram bloed meer te bezitten dan de tweede. Zij gingen nu het verdere verloop van het Hb-gehalte na en het bleek toen, dat op den eersten levensdag het Hb-gehalte van de bloedrijke groep 18% meer bedroeg, dan dat van de andere groep, terwijl op den 9en dag het verschil nog 17% bedroeg. Indien de O_2 -voorziening doorslaggevend was voor de mate van bloedafbraak, dan was te verwachten geweest, dat de bloedrijke groep na 9 dagen belangrijk meer Hb had afgebroken dan de „bloedarme“.

Ook langs experimenteelen weg heeft men getracht de theorie van Anselmino en Hoffmann aannemelijk te maken.

Giannini zag bij caviae, ratten en konijnen na een verblijf van 3—4 dagen in een atmosfeer van 30—35 c.m. Hg-druk een sterke stijging van Hb en Er.-waarden optreden, die 3 dagen na de terugkeer tot een normale O_2 -voorziening, weer tot de oorspronkelijke waarden waren gedaald. Deze afneming ging gepaard met een tijdelijke verhooging van het galkleurstoffengehalte in het bloed. Giannini vroeg zich af, of deze bilirubinstijging misschien veroorzaakt werd door leverbeschadiging. Vooral bij caviae treedt snel een leverdegeneratie op tijdens een langer aanhoudend O_2 -gebrek.

Goldbloom en Gottlieb deden dezelfde proeven bij caviae en zagen een teruggang van Hb en Er.waarden van 130% tot de norm in 5—8 dagen. Tevens trad een sterke bilirubinaemie op; bij 6 van de 12 proefdieren echter reeds vóór het begin der reacclimatiseering.

Lintzell en Radeff, Escobar en Baldwin, Gordon en Kleinberg vonden echter geen versterkte bloedafbraak en zijn daarom van meening, dat de teruggang tot normale waarden, die volgens hen veel later pas bereikt worden, tot stand komt door een verminderden bloedaanmaak. Lintzell en Radeff werkten met ratten en muizen en zagen, dat pas na 3—4 weken de oorspronkelijke Hb-waarden weer bereikt werden; Escobar en Baldwin noemen hiervoor

een termijn van 2 weken. Slechts in gevallen van zeer sterk uitgesproken polycythaemie, trad de eerste 24 uur een sterke daling van Hb-gehalte op. Volgens Vahlquist is dit echter een gevolg van het herstel der dehydratatie, die tijdens verblijf onder lagen druk zou optreden.

Vahlquist, die, evenmin als bij de pasgeborenen bij bovengenoemde proefdieren een versterkte bloedafbraak aanneemt, zegt, dat de bilirubinaemie veroorzaakt wordt door een leverbeschadiging, vooral ook, omdat dezelfde proefdieren tijdens haemolyse door phenylhydrazine als regel geen icterus vertoonen.

Als laatste bezwaar tegen de theorie van Anselmino en Hoffmann is aan te voeren, dat er niet aangegeven wordt, hoe de bloedafbraak tot stand komt. Een directe invloed van O_2 op erythrocyten is, onder physiologische verhoudingen, toch niet aannemelijk. Het lijkt ons mogelijk, dat de gedachtengang van Anselmino en Hoffmann wel juist is en dat de bloedafbraak optreedt om den pasgeborene aan te passen aan de nieuwe wijze van O_2 -voorziening, doch wij zijn van meening, dat dit bloedafbraakproces niet direct via de O_2 -voorziening wordt gereguleerd, maar dat een onafhankelijk chemisch mechanisme dit proces beheerscht. Hierdoor zou verklaard kunnen worden waarom soms in gevallen, waar de betrekkelijke O_2 -nood na de geboorte blijft bestaan (vitium cordis, praematuur), toch een bloedafbraak, met als gevolg een zichtbare icterus neonatorum, kan optreden.

HOOFDSTUK II.

INTRAVITALE HAEMOLYSE.

De bestanddeelen van het circuleerende bloed ondergaan, evenals alle weefsels in het lichaam, een voortdurende vernieuwing. Naast een geregelden aanmaak van nieuwe cellen, vindt steeds een daarmee gelijken tred houdende afbraak plaats. Men vindt in het perifere bloed, als uiting van de nieuwvorming, een zeker aantal jonge erythrocyten, die, na kleuring met brillant-cresyl-blauw, een meer of minder duidelijk netwerk vertoonen, de reticulocyten: als teeken van de voortdurende afbraak van erythrocyten, wordt een afbraakproduct van haemoglobine, n.l. bilirubine of urobiline met de faeces uitgescheiden. Vooral deze bloedafbraak, die bij verschillende pathologische toestanden in zeer versterkte mate kan optreden, is het onderwerp geweest van tal van onderzoeken.

Aanvankelijk werd aan den verminderden weerstand, die de erythrocyten vertoonden t.o.v. hypotone keukenzoutoplossingen, een zeer belangrijke beteekenis toegekend voor de versterkte bloedafbraak, en ook nu nog is de bepaling der osmotische resistentie van erythrocyten een, in de kliniek geregeld toegepaste, methode bij de diagnostiek van bloedziekten. De vernietiging der erythrocyten dacht men zich in de milt plaats te zullen vinden. Men stelde zich als regel dan voor, dat de minder resistente cellen uiteindelijk ten offer vielen aan de erythrocyten-vernietigende (phagocytээрende?) invloeden der miltulpacellen. Deze opvatting zou men kunnen betitelen als een cellulaire bloedafbraak-theorie.

Andere onderzoekers richtten vooral de aandacht op de beteekenis van de eigenschappen van het bloedplasma voor de intravitale haemolyse; dus op een humurale factor.

Chauffard vond, dat de weerstand van erythrocyten ten opzichte van keukenzoutverduunningen bij lijders aan haemolytischen icterus, geringer was dan bij normale personen. Hij vond bij deze patienten een beginnende haemolyse met 0.6%—0.7% NaCl en een complete haemolyse bij 0.33% NaCl. Voor normale erythrocyten liggen

deze waarden bij 0.48% resp. 0.28% NaCl. Naderhand werd dit verschijnsel bij vele gevallen van congenitalen haemolytischen icterus waargenomen. De bepaling van deze osmotische resistentie geschiedt als volgt: in een reeks buisjes, ieder gevuld met 1cc van keukenzoutverduunning, waarvan de concentratie in ieder der buisjes telkens 0.02% lager is dan in het voorafgaande, wordt een afgemeten hoeveelheid in physiologische zoutsolutie gewasschen erythrocyten gebracht. De inhoud der buisjes wordt goed gemengd, gedurende 1 uur op 37° verwarmd en vervolgens in de ijskast bewaard, tot alle niet gehaemolyseerde erythrocyten zijn bezonken. De aflezing geschiedt daarna als volgt: men noemt de zoutconcentratie, waarbij de bovenstaande vloeistof juist even rood gekleurd is door opgelost haemoglobine de minimale resistentie en die zoutconcentratie, waarbij juist geen erythrocyten meer op den bodem van het buisje aanwezig zijn de maximale resistentie.

Ook in de dierproef is deze vermindering der resistentie, vergeleken met die van normale erythrocyten, aantoonbaar na het parenteraal toedienen van haemolytisch werkende stoffen (Dameshek en Schwartz en anderen). Men vond een vrij duidelijke parallel tusschen de intensiteit der teweeggebrachte haemolyse en de osmotische resistentie der erythrocyten.

De osmotische resistentie der erythrocyten van pasgeborenen werd verschillend gevonden. Hampson onderzocht met een meer exacte methode dan de bovengenoemde de erythrocyten van navelstrengbloed en vond, dat de resistentie van deze erythrocyten iets geringer was dan normaal; de minimale resistentie viel bij 0.52% NaCl (normaal 0.48% NaCl), de maximale resistentie was ongeveer gelijk aan die van volwassenen-erythrocyten (0.28% NaCl).

Ook Goldbloom en Gottlieb vonden een verminderde osmotische resistentie van navelstreng-erythrocyten; latere onderzoekers, Waugh en ook Vahlquist, konden dit echter niet bevestigen.

Toch behoeft de osmotische resistentie van erythrocyten geen maat te zijn voor de intensiteit van de intravitale haemolyse. Het is zelfs in hooge mate onwaarschijnlijk, dat de intravitale haemolyse tot stand komt door verschillen in zoutconcentratie tusschen plasma en erythrocyten. Ook gaat de resistentie t.o.v. saponine-oplossingen dikwijls in het geheel niet parallel met de osmotische resistentie. Vele onderzoekers stelden vast, dat de erythrocyten van een diersoort met geringe osmotische resistentie een meer dan nor-

malen weerstand t.o.v. saponine bezaten. O.i. dient men een verminderde osmotische resistentie te zien als uiting van een minder goede conditie der erythrocyten door welke oorzaak dan ook.

Sedert de experimenten van Hamburger over het gedrag van roode bloedlichaampjes t.o.v. zoutoplossingen van verschillende concentraties, zijn er talloze onderzoekingen gepubliceerd over dit onderwerp. Hiervan hebben echter slechts weinige beteekenis gekregen voor toepassing in de kliniek, het meerendeel bewoog zich op het gebied van de theorieën over doorlaatbaarheid van celmembranen t.o.v. anionen en kationen.

Brinkman wees erop, dat de bepaling der osmotische resistentie met behulp van hypotone NaCl-verdunningen, geen juist beeld geeft van den werkelijken weerstand, die de erythrocytenmembraan t.o.v. verschillende electrolytconcentraties bezit. Hij bepaalde de osmotische resistentie in afdalende concentraties van een Naphosphaatbuffer of in Ringer's vloeistof en liet de erythrocyten niet te voren een waschproces ondergaan. Op grond van talrijke experimenten komt hij tot de conclusie, dat de resistentie-curve die op deze wijze verkregen wordt, een meer nauwkeurige afspiegeling is van de intensiteit der intravitale haemolyse. Werden tevoren de erythrocyten wel gewasschen in physiologische zoutsolutie, dan werd een resistentiecurve verkregen, die aanzienlijk naar links was verschoven, hetgeen wil zeggen, dat de resistentie geringer geworden was. Brinkman schrijft dit toe aan de lyotrope (vervloeierende) werking van het keukenzout op de lipoïeden der erythrocytenmembraan. Indien het bloed gewasschen werd met een isotonische Naphosphaatbuffer, dan bleek de osmotische resistentie verhoogd te zijn vergeleken met die van ongewasschen erythrocyten; volgens Brinkman was dit een gevolg van het uitwasschen van bepaalde lipoïeden uit de membraan. Bij het wasschen met isotonische NaCl-oplossing zou dit effect bedekt worden door de lyotrope werking van het NaCl. Hij noemt de resistentie van in Naphosphaat-buffer gewasschen erythrocyten de primaire resistentie, d.w.z. de resistentie, zooals de erythrocyt deze bezit, direct na de vorming in het beenmerg, en de resistentie der ongewasschen erythrocyten de secundaire, dus de resistentie zooals die naderhand door plasma-eigenschappen bepaald wordt. Hij verlegt hiermee dus de oorzaak van de wijzigingen in de fragilité globulaire van den erythrocyt naar het plasma en kent hierbij aan de lipoïeden in het plasma een

beslissende betekenis toe en wel in dien zin, dat een toeneming van het lecithine-gehalte bij een gelijkblijvend cholesterol-gehalte van het plasma een geringere resistentie der erythrocytenmembraan t.o.v. hypotonische zoutoplossingen (en misschien t.o.v. andere meer physiologische haemolytica?) teweegbrengt. Het lecithine zelf heeft een haemolytische werking op erythrocyten, hetgeen door Brinkman en door Hermann en Rohner in vitro, en door Brinkman ook in vivo bij het konijn, kon worden aangetoond.

Degkwitz ontkent echter het haemolytisch vermogen van lecithine en is van meening, dat Brinkman gewerkt heeft met gedeeltelijk afgebroken lecithine.

Door herhaalde intraveneuse lecithine-injecties bij een konijn kon Brinkman n.l. een haemolytische anaemie doen ontstaan, met een duidelijk verminderde secundaire resistentie der erythrocyten en een vrijwel gelijk blijvende primaire resistentie. Omgekeerd kon door intraveneuse cholesterol-injecties de secundaire resistentie zooveel verhoogd worden, dat deze bijna tot de primaire naderde.

Hiermede in overeenstemming zijn de huidige opvattingen over de fragilité globulaire bij haemolytischen icterus. Meende men aanvankelijk, dat de oorzaak gezocht moest worden in een foutieven aanleg der erythrocyten in het beenmerg, thans staat men overwegend op het standpunt, dat haemolytisch werkende stoffen (immuun-lichamen?) verantwoordelijk zijn voor de beschadiging der bloedlichaampjes.

De proeven van Dameshek en Schwartz bevestigen deze opvattingen nog eens. Zij spoten bij caviae intraperitoneaal een haemolyticum (amboceptor tegen cavia-erythrocyten) in en zagen dan een ziektebeeld ontstaan, dat veel overeenkomst vertoonde met den congenitalen haemolytischen icterus en dat gepaard ging met anaemie, sphaerocytose en verminderde osmotische resistentie der erythrocyten.

In de kliniek is over het gedrag der lipoïeden bij haemolytische toestanden betrekkelijk weinig bekend. Brinkman noemt onderzoeken van May, Gordon, Myers, Iscovesco, Bloor en Mc Pherson. Deze vonden allen bij anaemieën door versterkte bloedafbraak en bij de pernicieuze anaemie, een verlaging van het lipoïed-gehalte van het bloedserum, n.l. een vermindering van het cholesterol gepaard gaande met een relatief geringere afneming van het lecithine-gehalte; meestal was het lecithine/cholesterol-quotient in deze gevallen hoger dan normaal.

Ook onze eigen ervaring is, dat bij anaemieën, die gepaard gaan met een versterkte bloedafbraak, het normale lipoïed-evenwicht verstoord is. Wij vonden als regel lage waarden voor het cholesterolgehalte en een normaal, soms zelfs verhoogd, lipoïed-phosphorgehalte. Chamberlain vond bij haemolytischen icterus dikwijls een laag cholesterolgehalte in het bloed.

Muller vond bij de pernicieuze anaemie een laag cholesterolgehalte, dat bij een remissie een plotselinge stijging vertoonde. Deze stijging ging vooraf aan de verbetering der Hb.- en erythrocytenwaarden.

Chatterjee behandelde vrouwen lijdende aan macrocytaire zwangerschaps-anaemie met intramusculaire cholesterol-injecties met opvallend goed resultaat.

Pringsheim behandelde patienten lijdende aan paroxysmale haemoglobinurie met intramusculaire injecties van cholesterol-suspensies in olie met goed resultaat. Josephs behandelde patienten met sikkcel-anaemie met bloedtransfusies en naderhand met plasma-transfusies, waarvan hij een even goed resultaat zag. Hij meende daarom, dat het gunstig effect niet gezocht moest worden in een substitutie der erythrocyten, maar dat in het plasma stoffen aanwezig waren, die de abnormale bloedafbraak remden. Hij ging daarna nog een stap verder en spoot, i.p.v. het plasma zelf, de in alcohol oplosbare fractie van het plasma, gesuspendeerd in physiologische zoutoplossing, intramusculair in bij zijn patienten. Ook het resultaat van deze injecties was over het algemeen zeer gunstig; verdere splitsing van de bestanddeelen van het extract in een aether-oplosbare en een aether-onoplosbare fractie, bracht echter weinig opheldering over den aard van de werkzame remmende stof, door de wisselende resultaten, die na behandeling met elk der fracties werden verkregen. Waarschijnlijk zullen de hoofdbestanddeelen van het alcoholisch extract gevormd zijn door de lipoïeden en werd door de injectie van dit extract het (misschien gewijzigde) lipoïed-quotient van den patient in de richting van de normale verhouding gewijzigd. Josephs vermeldt in zijn publicatie éénmaal de intraveneuse toediening van lecithine aan een patient met sikkcel-anaemie, welke injectie prompt gevolgd werd door een sterke haemolytische crisis. Er wordt door hem echter geen commentaar op dit verschijnsel gegeven.

De haemolyse-remmende werking van plasma (of serum), zooals

Josephs die bij zijn patienten beschreef, was in vitro reeds langen tijd bekend.

Ransom toonde aan, dat de oplossende werking van saponine op erythrocyten geremd kon worden door toevoeging van kleine hoeveelheden serum en dat deze remmende werking toegeschreven moest worden aan het vrije cholesterol, dat in het serum aanwezig was. Naderhand is dit door vele onderzoekers bevestigd. Kofler en Schrutka hebben van een tiental saponine-soorten het cholesterol-bindend vermogen nagegaan en vonden daarbij een voor iedere soort zeer constante verhouding tusschen de hoeveelheid saponine en de hoeveelheid gebonden cholesterol. Volgens hun uitkomsten varieerden de hoeveelheden cholesterol, die noodig waren om 1 gram van iedere saponine-soort te ontgiften, tusschen 0.7 en 0.04 gram.

Ponder is van meening, dat de remming der saponine-haemolyse door serum in hoofdzaak is toe te schrijven aan de adsorptie van saponine aan de plasma-eiwitten, vooral, omdat de hoeveelheid cholesterol in het serum te gering zou zijn om alle saponine onwerkzaam te maken. Uit de curve en den bijbehorenden tekst, dien hij geeft, is af te leiden, dat 0.01 cc plasma in staat is 31 microgrammen saponine onwerkzaam te maken. Nemen wij aan een cholesterol-gehalte van het plasma van 200 mgr. dan bevat 0.01 cc plasma 0.02 mgr. cholesterol, waarvan ca. 0.007 mgr. in de niet veresterde, vrije vorm. Na omrekening zou dus in het voorbeeld van Ponder 1 gram saponine ontgift moeten kunnen worden door $\frac{7}{31} = \pm 0.22$ gram cholesterol, een hoeveelheid dus die goed past bij de uitkomsten van Kofler en Schrutka. Hoewel dus in het bloedserum cholesterol aanwezig is, in een hoeveelheid, die groot genoeg is om in het voorbeeld van Ponder, alle saponine onwerkzaam te maken, lijkt het ons evenwel toch waarschijnlijk, dat een deel der saponine onwerkzaam wordt door adsorptie aan de serum-eiwitten. Eigen nog te vermelden resultaten wijzen eveneens in deze richting.

Een ander verschijnsel, dat evenzeer met de verhouding der lipoïeden in het plasma verband houdt, is het volgende: bekijkt men in een dekglaspraeparaat een erythrocyten-suspensie in serum, dan vertoonen de bloedlichaampjes vrijwel alle den normalen biconcaven vorm; wast men de erythrocyten eenige malen in zout-solutie en brengt ze dan weer onder het dekglas, gesuspenseerd in physiologische zoutsolutie, dan vertoonen ze alle den bolvorm.

Brengt men ze echter, na het wasschen, in een 0.1 % cholesterol-suspensie in physiologische zoutoplossing onder het dekglas, dan is weer de oorspronkelijke biconcave vorm teruggekeerd.

Ponder beschrijft het optreden van bolvormen in een dekglaspraeparaat van erythrocyten in serum, na toevoeging van lecithine. Vrij algemeen wordt de overgang der erythrocyten in vitro van den biconcaven in den sphaerischen vorm beschouwd, als een voorstadium der haemolyse. Over de oorzaken, welke het optreden van vormveranderingen der erythrocyten in een dekglaspraeparaat beïnvloeden, zijn de meeningen zeer verdeeld; doch in elk geval is hierbij een duidelijk antagonisme tusschen cholesterol en lecithine aantoonbaar en wel in dien zin, dat cholesterol de haemolyse-neiging tegengaat en lecithine deze bevordert.

Degkwitz vermeldt tal van andere onderzoekingen, waarbij het antagonisme tusschen lecithine en cholesterol duidelijk aan den dag treedt, zooals haemolyse door bacterie- en slangengiften, gevoeligheid voor diphtherie- en tetanus-toxine bij muizen, phagocytose zowel in vitro als in vivo, bezinkingssnelheid der erythrocyten, regulatie van den tonus. In het algemeen werd als normale verhouding van lecithine/cholesterol een waarde van 3:1 gevonden, d.w.z. naast 3 mgr. lecithine dient onder normale omstandigheden 1 mgr. vrij cholesterol aanwezig te zijn. Voor de verhouding bij de phagocytose-proeven vond hij echter 2:1.

Brinkman is van meening, dat de bepaling van de getal-verhouding tusschen biconcave en sphaerische vormen in een dekglaspraeparaat van erythrocyten in bijbehorend serum, de meest nauwkeurige en gevoelige methode is, om een beginnende haemolyse-neiging en dus een geringe toeneming van de intravitale bloedafbraak aan te toonen.

De beteekenis van het lecithine voor de bloedafbraak is in ander verband aangetoond door Fåhræus en Bergenheim. Zij vonden, dat citraatbloed, dat eenige uren bij lichaamstemperatuur bewaard was, een lagere bezinkingssnelheid der erythrocyten vertoonde, dan onmiddellijk na de venapunctie. Dit verschijnsel trad ook op, wanneer het plasma alleen werd verwarmd en naderhand weer bij de erythrocyten werd gevoegd. Het bleek hun, dat de erythrocyten in het verwarmde bloed in grooter aantal dan te voren een bolvorm hadden aangenomen en zeer weinig neiging hadden samen te ballen tot geldrolvormen. Deze toeneming van volume en de ge-

ringe autoagglutinaties waren de hoofdoorzaken voor de vermindering der bezinkingssnelheid. Het geheel van deze verschijnselen noemden ze: stabilisatie van een erythrocyten-suspensie en zij meenden, dat er tijdens de verwarming een stof gevormd werd, die de eigenschappen der erythrocyten wijzigde. Bij verder onderzoek bleek, dat het proces, waarbij de stabiliseerende stof gevormd werd, het karakter had van een fermentreactie. De optimale voorwaarden waren: temperatuur 42°C en P_H 7.2. Het ferment is zeer thermolabiel (10 min. verwarming op 56°C . maakt het onwerkzaam) en het is door een lipasegif, zooals chininechloride in zeer zwakke concentratie, onwerkzaam te maken. Door extractie met alcohol, kan de stabiliseerende stof uit verwarmd plasma verwijderd worden. Na indampen van het alcoholextract tot een gering volume, wordt door toevoeging van de zesvoudige hoeveelheid aether een neerslag verkregen, dat goed oplosbaar is in water en waarin de stabiliseerende stof aanwezig is. Steunend op publicaties van Cohnheim en Michaelis (1897), van Weigert en van Thiele (1913), namen Fåhræus en Bergenhem aan, dat de stabiliseerende stof een afbraakproduct was van lecithine, n.l. het lysolecithine.

Dit lysolecithine was reeds bekend als een haemolytisch werkend product, dat uit lecithine gevormd werd door inwerking van cobratoxine. Vooral Delezenne en Ledebt toonden aan, dat deze omzetting van lecithine een fermentatief proces is, waarbij door het lecithinase, dat in cobragif voorkomt, een onverzadigd vetzuur van het lecithine wordt afgesplitst. Het lysolecithine geeft tot in hooge verdunning haemolyse van erythrocyten. Fåhræus en Bergenhem konden met lysolecithine, bereid uit lecithine en cobragif, na toevoeging aan erythrocyten-suspensies in serum, een sterke stabilisatie van deze suspensie aantoonen en wel met hoeveelheden lysolecithine, die nog geen merkbare haemolyse veroorzaakten. Zij zagen in deze stabilisatie (aannemen van bolvorm en verminderde geldrolvorming) een voorstadium der haemolyse.

In hoeverre het afgesplitste onverzadigde vetzuur een stabiliserenden invloed heeft, is nog weinig nagegaan. Fåhræus en Bergenhem vermelden hierover, dat de invloed van dit zuur in mgr. % uitgedrukt zeker $10 \times$ geringer is, dan die van lysolecithine. Neemt men daarbij dan nog in aanmerking, dat het moleculair gewicht van lysolecithine, belangrijk grooter is, dan dat van het onverzadigde vetzuur en dat er van beide evenveel moleculen aan-

wezig zijn, dan komt men tot de conclusie, dat het grootste gedeelte van het stabiliseerend effect aan het lysolecithine kan worden toegeschreven.

Fåhræus en Bergenheim konden uit onverwarmd en uit verwarmd plasma het lysolecithine extraheeren en wel uit het verwarmde plasma in acht maal zoo groote hoeveelheid als uit het onverwarmde.

Bergenheim vond tevens, dat de vorming van lysolecithine in bloed slechts plaats vond, indien er geen beweging in de vloeistof was gedurende de verwarming. In vitro toonde hij dit aan, door van een hoeveelheid paardbloed (gedefibrineerd) de eene helft regelmatig in schommelende beweging te houden bij lichaamstemperatuur en de andere helft bij dezelfde temperatuur rustig te laten staan. Het bleek, dat in het bloed, dat in regelmatige beweging gehouden werd, geen merkbare stabilisatie was opgetreden.

In vivo toonden Fåhræus en Bergenheim de beteekenis van het in rust verkeereren van het bloed voor de stabilisatie op de volgende wijze aan: een gedeelte van de arteria carotis van een kat werd op twee plaatsen afgebonden. Na eenige uren werd uit dit afgebonden gedeelte een bloedmonster genomen en microscopisch vergeleken met een bloeddruppel uit het oor van dezelfde kat. Er bleek in het eerste monster vrijwel geen geldrolvorming te bestaan terwijl van de erythrocyten vele den bolvorm en doornappelvorm hadden aangenomen; in het praeparaat van het perifere bloed werd sterke geldrolvorming en geen doornappels en bolvormen waargenomen.

De beteekenis van het gedurende eenige uren in rust verkeereren van het bloed, de z.g. „endopauze”, voor het optreden van het stabiliseerend effect en dus van de lysolecithine-vorming, gaf Fåhræus en Bergenheim aanleiding na te laten gaan of misschien de milt, waar geregeld bloed gedurende eenige uren buiten de circulatie wordt bewaard, een rol speelde bij de vorming van lysolecithine. Reeds vroeger was bekend, dat het miltvenabloed erythrocyten bevatte, die minder afgeplat waren en een kleineren diameter bezaten dan normaal.

Gawrilow vond nu, dat de bezinkingssnelheid der erythrocyten in het veneuze bloed van lever, milt en nieren lager was dan in het bloed uit de vena jugularis.

Berglund heeft op instigatie van Fåhræus de bezinkingssnelheid

nagegaan in het miltvenebloed van paarden. Hij vond gemiddeld aanzienlijk lagere waarden voor de bezinking in het miltvenebloed, dan in het miltarteriebloed.

Brinkman vond, dat miltvene-erythrocyten t.o.v. hypotonische fosphaatbuffer een geringere resistentie vertoonden dan erythrocyten van het arterieele bloed. Na wasschen met isotonische fosphaatbuffer bleken beide erythrocyten-soorten dezelfde primaire resistentie aan te nemen.

Op grond van deze onderzoeken van Gawrilow en Berglund nemen Fåhræus en Bergenhem aan, dat in de milt, tijdens het in rust verkeer van het bloed gedurende eenige uren, de z.g. endopauze, lysolecithine gevormd wordt, dat een beschadiging der erythrocyten teweegbrengt en de minst weerstandskrachtige onder hen vernietigt.

Door deze theorie over de bloedafbraak, is dus de functie van de milt, aan welk orgaan men reeds van oudsher een rol toekende bij de bloedafbraak, tot een onderdeel geworden van een humorale verklaring van de bloedafbraak, terwijl te voren de milt meest beschouwd werd als een erythrocyten-phagocyteerend orgaan.

Singer vergeleek het lysolecithine-gehalte van bloedserum vóór en na bebroeden. Hij vond in bloed, genomen uit de vena cubiti na het bebroeden een lysolecithinegehalte, dat gemiddeld $8 \times$ grooter was dan dat van onbebroed serum.

Onderzocht hij echter miltaderbloed op dezelfde wijze dan bleek, dat door incubatie geen toeneming van het lysolecithine plaats vond. Echter was het totale lysolecithinegehalte van het miltaderbloed vóór het bebroeden reeds gelijk aan dat van peripheer bloed na de incubatie. Dit is wel op te vatten als bewijs, dat in de milt tijdens de endopauze een lysolecithine-vorming plaats vindt.

Het zelfde verschijnsel vond hij tevens in bloed, genomen uit groote varices.

Hij kon echter geen verschil vinden in resistentie der erythrocyten uit miltvene- en miltarterie-bloed t.o.v. lysolecithine. Het feit echter, dat hij de erythrocyten vóór de resistentiebepaling eenige malen wast met physiologische zoutsolutie is hierbij misschien van beslissende beteekenis.

Afgezien van deze lipoïed-theorieën is reeds langeren tijd bekend, dat bij enkele ziekten, waarbij een verhoogde bloedafbraak op den voorgrond staat (o.a. congenitale haemolytische icterus, acute

haemolytische anaemieën, paroxysmale haemoglobinurie) in het bloedserum soms haemolysinen tegen de eigen erythrocyten kunnen worden aangetoond. Aan deze haemolysinen wordt door velen een causale beteekenis toegekend. Bij dierproeven bleek inderdaad, dat door injectie van amboceptoren, gericht tegen de erythrocyten van het dier, een haemolytische anaemie veroorzaakt kon worden. Heilmeijer, die de resultaten van Bergenhem en Fähræus bevestigde, is van meening, dat bij den haemolytischen icterus naast vermeerderde lysolecithinehaemolyse, soms ook andere oorzaken verantwoordelijk kunnen zijn (amboceptoren). Hij noemt o.a. Gripwal, die bij haemolytischen icterus normale, of zelfs iets beneden normale lysolecithinewaarden vond in het bloedserum.

Singer vond bij een zestal van deze patienten normale tot iets verhoogde lysolecithinegehalten in het serum en geeft als zijn meening, dat bij deze pathologische toestanden als regel de haemolyse niet door vergrootte lysolecithinevorming kan worden verklaard. Bij een gedeelte van zijn patienten vond hij wel een verminderde lysolecithine-resistentie der erythrocyten.

Heilmeijer bevestigt de reeds vroeger geuite veronderstelling, dat de vorm- en resistentieverandering der erythrocyten bij haemolytische toestanden, een gevolg is van humorale haemolytische factoren en niet toe te schrijven is aan een foutieven aanleg der erythrocyten. Ook Mimo en Momigliano schrijven de resistentieveranderingen toe aan humorale invloeden; zij konden n.l. aantoonen, dat ook door bloedtransfusie ingebrachte, normale erythrocyten bij een haemolytische crisis dezelfde vormveranderingen ondergaan als de oorspronkelijke bloedlichaampjes.

Het lijkt evenwel niet waarschijnlijk, dat aan amboceptoren een beteekenis moet worden toegekend bij de physiologische bloedafbraak van den pasgeborene. Lenart is van meening, dat de bloedafbraak bij pasgeborenen een gevolg is van isoagglutininen van de moeder, die via de placenta in de kinderlijke circulatie geraken en daar aanleiding geven tot haemolyse. Deze overgang van iso-agglutininen zou dus alleen tot haemolyse bij de vrucht aanleiding kunnen geven, indien in het kinderlijke bloed agglutinogenen voor die agglutininen aanwezig zijn; dus niet bij een kind met bloedgroep O en nooit bij gelijke bloedgroep van moeder en kind. Statistisch komt dan volgens Lenart 26 % van de geboren kinderen in aanmerking voor het optreden van icterus neonatorum. Dit percentage

kan zijns inziens dan nog verhoogd worden met die gevallen, waarbij, hoewel moeder en kind dezelfde bloedgroep bezitten, bij de directe proef toch blijkt, dat het serum van de moeder de erythrocyten van het kind agglutineert. Deze theorie van Lenart kan echter geen verklaring geven voor het vaststaande feit, dat alle neonati in de eerste levensweek een stijging van het bilirubine-gehalte van het bloedserum vertoonen, die niet enkel aan leverstoornissen kan worden toegeschreven.

De beide verklaringen van Brinkman en van Bergenhem en Fåhræus hebben nog weinig toepassing gevonden voor de neonatale periode. Er zijn gegevens bekend, die erop wijzen, dat de verhoudingen tusschen de lipoïeden en hun absolute waarden bij den pasgeborene afwijken van de normale. Uit veler onderzoekingen blijkt n.l., dat het navelstrengbloed en het bloed in de eerste levensdagen een cholesterolgehalte heeft, dat aanzienlijk beneden de normale waarde ligt; het bedraagt $\pm 50-70$ mgr. % (Sperry). Ook het gehalte aan lipoïed-phosphor is verlaagd ($4-6$ mgr. %), doch in verhouding minder dan het cholesterol-gehalte. Wij vinden hier dus een overwegen van het lecithine, hetgeen volgens Brinkman en van Dam gepaard zou gaan met een sterkere neiging tot haemolyse en een geringere osmotische resistentie; en tevens een lager cholesterol-gehalte, waardoor mogelijk een geringere hoeveelheid remmende stof voor een haemolytisch werkend agens aanwezig is.

Over het lysolecithine-gehalte van navelstrengbloed is door Bogaert het vermoeden uitgesproken, dat het grooter zou zijn dan van normaal bloed. Hij vergeleek de bezinkingssnelheid der erythrocyten van moederlijk bloed en van navelstrengbloed en vond respectievelijk 23 en 2 m.m. na 1 uur. Wanneer hij de erythrocyten van het navelstrengbloed bracht in het plasma van het moederlijke bloed en omgekeerd, dan wijzigden de valsnelheden zich in dien zin, dat de erythrocyten van het kind nu na 1 uur 31 m.m. gedaald waren en die van de moeder in het navelstrengbloed slechts 3 m.m. waren bezonken.

Hij schrijft daarom aan het navelstrengplasma stabiliseerende eigenschappen in den zin van Bergenhem en Fåhræus toe en oppert de veronderstelling, dat, naast een gering verschil in globuline-gehalte, vooral het verschil in cholesterol-gehalte van moederlijk en kinderlijk plasma hierbij beteekenis kan hebben.

Hij ging tevens na de remmende werking van sera op de hae-

molyse door lysolecithine. De remming door pasgeborenen-serum was aanmerkelijk geringer, dan de remming door volwassenen-serum.

Ook van Rossum vond een geringere remming der lysolecithine-haemolyse door navelstrengserum dan door volwassenen-serum.

HOOFDSTUK III.

EIGEN ONDERZOEKINGEN.

In het eerste gedeelte van het te beschrijven onderzoek zijn neergelegd de resultaten van de onderzoekingen, die betreffen de lysolecithine-winning, de vorming van lysolecithine in volwassenen- en pasgeborenen-bloed en de invloed van lipoïeden en andere serumbestanddeelen op de vorming ervan; tevens zijn eenige onderzoekingen gewijd aan de beteekenis der lipoïeden voor de resistentie der erythrocyten.

In een volgend gedeelte zijn de resultaten neergelegd van onderzoekingen, die bij een aantal pasgeborenen op de Verloskundige Kliniek werden verricht, in verband met de in het eerste gedeelte verkregen uitkomsten.

De bijzondere uitgebreidheid van het gekozen onderwerp en de nog geringe klinisch-experimenteele ervaring over de humorale theorie der bloedafbraak, brachten mee, dat tijdens het onderzoek zich telkens zijwegen in verschillende richtingen openden; we hebben echter gemeend eerst den hoofdweg te moeten gaan, teneinde naderhand, onder gunstiger omstandigheden, misschien de gelegenheid te vinden enkele details nader uit te werken. Vooral op chemisch en quantitatief gebied is een dergelijke aanvulling gewenscht. Zelfs een eenigszins benaderend onderzoek in deze richting is ons door de omstandigheden niet mogelijk geweest, temeer omdat de behoefte aan deze completeering eerst gevoeld werd, toen het overige onderzoek reeds beëindigd was.

Eerste gedeelte.

1. Lysolecithine-winning.

De bereiding van lysolecithine uit serum, dat gedurende eenige uren bij een temperatuur van 37° C. bewaard is, vindt volgens Singer het best op de volgende wijze plaats. Aan het serum, dat gedurende 24 uur bij een temperatuur van 37° bewaard is, wordt een

9-voudige hoeveelheid aethylalcohol 96 % toegevoegd, vervolgens wordt deze oplossing gefiltreerd en het heldere filtraat in vacuo bij kamertemperatuur ingedampt tot droog. De droogrest, die zouten, enkele eiwitresten, vet en lipoïeden bevat, wordt geëxtraheerd met alcohol 96 %, het heldere extract in een klein kolfje gebracht en de 6-voudige hoeveelheid aether toegevoegd, waardoor een vlokkelig neerslag zich vormt, dat bij bewaren in de ijskast zich in eenige uren op den bodem afzet. Het heldere alcohol-aether mengsel kan gemakkelijk afgeschonken worden; het resteerende neerslag wordt eenigen tijd ($\pm$ 15 minuten) bij kamertemperatuur aan de lucht gedroogd, teneinde alle aetherresten te verwijderen en kan vervolgens geheel opgelost worden in physiologische zoutsolutie, waarbij een licht opalesceerende oplossing wordt verkregen.

De bereidingswijze, welke door Bergenheim en Fahraeus werd beschreven, stemt met de bovengenoemde vrijwel geheel overeen.

Bij onze onderzoeken hebben wij de werkwijze van Singer nauwkeurig gevolgd; het serum werd steeds 24 uur bij 37° C bewaard en daarna verwerkt; bij alle experimenten werd het lysolecithine-neerslag met steriele physiologische zoutsolutie gebracht op $\frac{1}{10}$ deel van het serum-volume, waarvan werd uitgegaan. Belangrijke moeilijkheden werden bij de bereiding van het lysolecithine niet ondervonden; nauwkeurig gereinigd glaswerk, steriele winning van het serum en nauwkeurig opvolgen van de aangegeven verhoudingen van alcohol en aether zijn echter voor het verkrijgen van constante resultaten met eenzelfde serummonster van groot belang.

Over den aard van de op deze wijze verkregen haemolytisch werkende stof hebben wij geen nadere onderzoeken verricht. Slechts hetgeen Fähræus hierover meedeelt hebben wij kunnen bevestigen, n.l. dat in het neerslag aanwezig is een in water oplosbare stof, die van organisch karakter is, gemakkelijk aanleiding geeft tot schuimvorming en P-houdend is.

De bereidingswijze, welke door Bergenheim en Fähræus werd verwerking van 10 cc versch onbebroed serum en van 10 cc serum, dat 24 uur op 37° C. verwarmd is geweest, blijkt, dat in het eerstgenoemde neerslag zich slechts een uiterst geringe, niet te bepalen hoeveelheid organisch P bevindt, terwijl het neerslag verkregen van het bebroede serum ongeveer 0.3—0.5 mgr. % P bevat. Hieruit meenen wij te kunnen besluiten, dat de bovengenoemde haemoly-

tisch werkzame stof, gedurende de verwarming zich vormt uit een bestanddeel van het serum. Ook macroscopisch is dit reeds goed waar te nemen; het neerslag, dat zich onmiddellijk na toevoeging van aether aan het alcohol-extract vormt, is bij het verwarmde serum veel intensiever dan bij het onverwarmde. Op grond van bovengenoemde eigenschappen nam Fåhræus aan, dat de haemolytische (stabiliseerende) stof in bloedserum identiek was met het lysolecithine, dat door cobragif uit lecithine gevormd wordt en eveneens sterk haemolytische eigenschappen bezit. Het is ons evenwel gebleken, dat het natuurlijke lysolecithine in enkele opzichten afwijkt van het cobra-lysolecithine, en wel in bestendigheid. Het cobra-lysolecithine is volgens alle onderzoekers een stof, die tamelijk resistent is tegen hoge temperaturen (koken) en volgens van Rossum, onder aether bewaard, maandenlang zijn haemolytisch vermogen onverminderd behoudt.

Onze ervaringen met het natuurlijke lysolecithine hebben ons geleerd, dat het neerslag, opgelost in physiologische zoutsolutie, gedurende enkele uren bij kamertemperatuur aan licht en lucht blootgesteld, het haemolyseerend vermogen vrijwel geheel verliest, terwijl verwarming tot 56° C. eveneens de stof onwerkzaam maakt. Wij achten het echter mogelijk, dat dit onderscheid toch enkel een gevolg is van een verschil in concentratie; van Rossum spreekt over verdunningen van zijn lysolecithine, gevormd door inwerking van cobra-gif op eierdooier, tot 1 : 20.000 en 1 : 40.000, terwijl ons „natuurlijke” lysolecithine hoogstens werkzaam was tot een verdunning van 1 : 32 tot 1 : 64.

Singer vermeldt niet, dat het door hem bereide lysolecithine eveneens een labiele stof is, doch het feit, dat hij het indampen van het alcoholisch serum-extract bij kamertemperatuur laat plaats vinden, doet vermoeden, dat hij van meening is, dat het toepassen van een hogere temperatuur de lysolecithine-opbrengst ongunstig beïnvloedt.

De hoeveelheid uit serum verkregen lysolecithine werd bepaald door na te gaan welke verdunning ervan een bepaalde erythrocyten-concentratie nog geheel haemolyseerde in een bepaalden tijdsduur. De lysolecithine-opbrengst werd identiek beschouwd met de werkzaamheid.

Wij volgden hiertoe de eveneens door Singer beschreven werkwijze. Van de verkregen lysolecithine-oplossing in zoutsolutie

($\frac{1}{10}$ van het oorspronkelijke serumvolume) wordt een verdunningsreeks gemaakt, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, enz. Bij deze verschillende verdunningen worden zooveel roode bloedlichaampjes gevoegd, dat de totale concentratie der erythrocyten 2 % bedraagt. De praktische uitvoering geschiedt aldus, dat de erythrocyten-suspensie (20 %) in een leucocyten-pipet wordt opgezogen tot deelstreep 1 en de pipet vervolgens wordt volgezogen tot deelstreep 11 met de lysolecithineverdünnungen. De eindconcentratie van lysolecithine bedraagt dan $\frac{10}{11} \times$ die van de oorspronkelijke verdunningen of 1 : 2.2, 1 : 4.4, 1 : 8.8, 1 : 17.6 enz. Aangezien alle lysolecithine-titraties echter op dezelfde wijze werden uitgevoerd, hebben wij gemakshalve de verdunningsreeks steeds aangeduid als 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 enz.

De gevulde pipetten worden gedurende 1 uur in de broedstoof gebracht en daarna wordt in een telkamer v. Bürker het aantal erythrocyten bepaald, dat nog niet gehaemolyseerd is. Als controle wordt een pipet bijgevoegd, waarin dezelfde erythrocyten-concentratie in physiologische zoutsolutie. Singer rekent, indien minder dan 10 % der erythrocyten niet gehaemolyseerd zijn, de haemolyse compleet; indien meer dan 10 % niet gehaemolyseerd zijn, drukt hij de sterkte der haemolyse uit in het percentage wel-gehaemolyseerde cellen.

Wij hebben eveneens deze werkwijze gevolgd, echter met dit verschil, dat we de haemolyse van meer dan 90 % der cellen compleet (· ·) genoemd hebben en indien we waarden vonden beneden 90 %, de haemolyse negatief (—) hebben beschouwd. Voor het grootste deel onzer experimenten is deze betrekkelijk ruwe scheiding tusschen positieve en negatieve haemolytische werkzaamheid van een lysolecithine-verdünnung ruimschoots voldoende gebleken. Slechts in gevallen waar de gevonden verschillen zeer gering waren, hebben wij door het nauwkeurig tellen der erythrocyten ook de geringere graden van haemolyse vermeld. Als erythrocyten-suspensie werd steeds gebruik gemaakt van een suspensie van 3 % in physiologische zoutsolutie gewasschen, eigen erythrocyten.

2. Lysolecithine-vorming uit sera.

Na bebroeden van normaal serum en van normaal citraat-plasma van volwassenen, kon hieruit op de boven beschreven wijze een

hoeveelheid lysolecithine gewonnen worden, die tot in een verdunning van gemiddeld 1 : 16 complete haemolyse teweegbracht in een 2 % erythrocyten-suspensie in physiologische zoutsolutie.

Bij vergelijkende proeven over de lysolecithine-opbrengst na bebroeden van volwassenen- en van navelstrengserum, werden steeds beide serum-monsters gelijktijdig naast elkaar verwerkt, teneinde onregelmatigheden door ongelijke omstandigheden zooveel mogelijk uit te schakelen.

Het bleek ons, dat de vorming van lysolecithine in navelstrengserum in sterkere mate plaats vindt dan in volwassenen-serum, doch dat ook onderling de navelstrengsera nogal uiteen loopen, hetgeen bij volwassenen-sera lang niet in die mate het geval is.

Wij konden na bebroeden van navelstrengsera hieruit een hoeveelheid lysolecithine winnen, welke tot 2—3 maal zoo groot was als uit volwassenen-serum (zie tabel).

	Volwassenen- serum	Navelstreng- serum
1. Complete haemolyse door het lysolecithine tot in ver- dunning van	1/16	1/32
2. " "	1/16	1/32
3. " "	1/16	1/48
4. " "	1/16	1/32
5. " "	1/16	1/16
6. " "	1/16	1/32
7. " "	1/16	1/32
8. " "	1/16	1/32
9. " "	1/16	1/16
10. " "	1/16	1/48

Voor deze grootere opbrengst kunnen verschillende factoren van belang zijn:

- a. De hoeveelheid substraat, dus het gehalte aan lipoied-phosphor (lecithine hoofdzakelijk), in het navelstrengserum is gemiddeld belangrijk lager dan in volwassenenserum (resp. $\pm$ 100—125 mgr. % en 200—250 mgr. %), en hierom dus niet een waarschijnlijke oorzaak.

- b. Het is mogelijk, dat het phosphatide-splitsend vermogen (lecithinasegehalte) van navelstrengserum grooter is dan van volwassenen-bloed.
- c. Ten slotte bestaat de mogelijkheid, dat er in navelstrengserum minder stoffen voorkomen, die de phosphatide-splitsing remmen, of het gevormde lysolecithine onwerkzaam maken.

Als één van de meest in het oog springende verschillen tusschen volwassenen- en navelstrengserum is in de eerste plaats het cholesterol-gehalte te noemen.

Het leek ons van belang na te gaan of het cholesterol, evenals ten opzichte van saponine, ook ten opzichte van lysolecithine antagonistisch werkzaam is en of door het lagere cholesterol-gehalte van navelstrengserum hieruit meer lysolecithine gewonnen kan worden. De onoplosbaarheid van cholesterol in water maakt het vrijwel onmogelijk, het cholesterol direct aan het serum toe te voegen voordat dit in de broedstoom geplaatst wordt. We hebben er daarom mee volstaan het cholesterol pas toe te voegen aan het alcoholisch serum-extract vóórdat dit drooggedampt wordt:

40 cc volwassenenserum (cholesterol-gehalte 210 mgr. %) wordt 24 uur op lichaamstemperatuur verwarmd en daarna tot 400 cc aangevuld met 96 % alcohol en gefiltreerd. 200 cc van het heldere filtraat wordt normaal verder verwerkt tot lysolecithine en aan de andere 200 cc wordt 100 mgr. cholesterol „Merck” toegevoegd en daarna eveneens tot lysolecithine verder verwerkt.

Bij titratie van de verkregen lysolecithine-oplossingen wordt gevonden:

1. normale bereidingswijze: 100 % haemolyse tot in verdunning van 1/16.
2. na toevoeging van cholesterol: 100 % haemolyse tot in verdunning van 1/4.

Uit deze proef blijkt dus een belangrijke afneming van de lysolecithine-opbrengst door toevoeging van cholesterol aan het alcoholisch serumextract.

De uitkomst van een soortgelijke proef met serum van een pasgeborene was als volgt:

Complete haemolyse door lysolecithine tot in verdunning van:

1. Navelstrengserum	}	1/48
totaal chol. gehalte 63 mgr. %		
2. Zelfde serum	}	1/16
chol. kunstmatig verhoogd tot 100 mgr. %		
3. Idem	}	1/8
chol. kunstmatig verhoogd tot 200 mgr. %		
4. Idem	}	1/1
chol. kunstmatig verhoogd tot 300 mgr. %		

Het toegevoegde cholesterol was een praeparaat van de firma „Merck” en bevatte alleen „vrij cholesterol”. Daar, naar analogie met de verhouding cholesterol/saponine, wel aangenomen mag worden, dat alleen het „vrije” cholesterol een anti-lysolecithine werking heeft, staat dus een kunstmatige verhooging van het cholesterolgehalte van navelstreng-serum tot 200 mgr. % niet gelijk met de verhouding, zooals die in serum van volwassenen voorkomt; eerder zal het serummengsel onder no. 2 genoemd, overeenstemmen met de normale volwassenen-verhouding, wat betreft het gehalte aan „vrij” cholesterol.

Uit de genoemde resultaten (waarmee identieke proeven goed overeenstemmen) is af te leiden, dat het cholesterol in het serum, op de lysolecithine-opbrengst een ongunstigen invloed heeft. Op welke wijze deze invloed tot stand komt, is niet met zekerheid te zeggen, doch naar analogie met de saponine-haemolyse lijkt het meest waarschijnlijk de vorming van een binding tusschen cholesterol en lysolecithine, waardoor dit laatste onwerkzaam wordt als haemolyticum. Een meer quantitatieve uitwerking van de verhouding cholesterol/lysolecithine is door ons niet uitgevoerd.

Een ander belangrijk verschil tusschen normaal volwassenen-serum en dat van een pasgeborene, is gelegen in het gehalte aan hormonen. Tot aan de geboorte, en zelfs nog eenige dagen langer, verkeert de neonatus, evenals de moeder, onder geheel andere

hormonale verhoudingen dan later. Tijdens de graviditeit circuleeren in het moederlijke en foetale lichaam gonadotrope en oestrogene hormonen in vele malen sterkere concentratie dan naderhand. Tot nu toe is van paediatrische zijde hieraan weinig aandacht geschenken; slechts bij te-vroeggeborenen is de veronderstelling geuit, dat de foetus, door het te vroeg geboren worden, te spoedig een tekort zou krijgen aan deze hormonen en door enkelen is de hormoon-toediening aan vroeggeborenen gepropageerd geworden. Een goed gefundeerd oordeel over de al of niet heilzame werking ervan is nog niet verkregen. Als hormoon werd toegepast één der vormen van het oestron, het follikelhormoon.

De Snoo kwam langs empirischen weg ertoe, om de hormoontherapie met follikelhormoon toe te passen bij icterus gravis neonatorum en zag van deze therapie goede resultaten.

Het leek ons van belang om na te gaan of het follikelhormoon invloed uitoefende op de vorming van lysolecithine in serum. Als follikelhormoon-praeparaat werd gekozen het „Menformon” van „Organon”, een oplossing van oestron in water, bevattende 100 of 1000 M.E. per c.m.³

Van 40 cc volwassenenserum werd 20 cc gedurende 24 uur bij lichaamstemperatuur gebracht en het gevormde lysolecithine gewonnen; aan de overige 20 cc werd 100 M.E. Menformon toegevoegd en deze portie werd daarna verder bewerkt als het eerstgenoemde serummonster.

De titratie van het verkregen lysolecithine gaf de volgende uitkomsten:

20 cc serum zonder Menformon: complete haemolyse tot in verdunning van $1/16$.

20 cc serum met 100 M.E. Menformon: complete haemolyse tot in verdunning van $1/2$.

Andere proeven gaven de volgende resultaten:

30 cc serum zonder Menformon: complete haemolyse tot in verdunning van $1/16$.

30 cc serum met 100 M.E. Menformon: complete haemolyse tot in verdunning van $1/4$.

en

20 cc serum zonder Menformon: complete haemolyse tot in verdunning van $1/16$.

20 cc serum met 100 M.E. Menformon: complete haemolyse tot in verdunning van $\frac{1}{4}$.

De concentratie van het Menformon was hierbij dus respectievelijk 500, 333 en 500 M.E. per 100 cc.

Het verslag van een andere proefopstelling luidt als volgt:
60 cc volwassenen-serum wordt verdeeld over 6 buisjes, ieder 10 cc serum bevattend. Aan 3 der buisjes wordt 50 M.E. Menformon toegevoegd, en aan de andere drie een even groote hoeveelheid ($\frac{1}{2}$ cc) physiologische zoutsolutie. Daarna worden alle 6 buisjes in de broedstoof geplaatst bij een temperatuur van 37° C. Na 6, 9 en 18 uur worden telkens een serummonster met en één zonder hormoon-toevoeging uit de broedstoof genomen en van beide het lysolecithine op de gebruikelijke wijze bereid. De titratie van het lysolecithine hebben wij in dit geval iets anders uitgevoerd. Van het lysolecithine werd een verdunningsreeks gemaakt: $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, waarbij van iedere verdunning 1 cc in een buisje werd gebracht. Vervolgens werd aan iedere verdunning 0.1 cc van een 20 % verdunning van gewassen erythrocyten toegevoegd. Na een verblijf van 1 uur bij een temperatuur van 37° C werden de buisjes gecentrifugeerd en in de bovenstaande vloeistof het Hb-gehalte bepaald, met behulp van den photometer van Pulfrich.

De uitkomsten waren als volgt:

		lysolecithine werkzaam tot in verdunning van:				
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
serum zonder Menformon	6 uur op 37° C	+	+	—	—	—
		 haemolyse				
serum met Menformon		+	—	—	—	—
idem	9 uur op 37° C	+	+	+	—	—
		+	+	—	—	—
idem	18 uur op 37° C	+	+	+	+	—
		+	+	—	—	—

Uit het resultaat van deze proef en eveneens uit hiermee identieke proeven, waarbij het tijdsinterval en de hoeveelheid gebruikt serum eenigszins afweken, blijkt, dat het Menformon een duidelijk remmenden invloed heeft op de lysolecithine-vorming.

Zulk een proef gaf de volgende uitslag:

Aan 3 van 6 buisjes met ieder 5 cc. serum werd Menformon toegevoegd (20 M.E.). Na 9, 18 en 24 uur werd telkens van een buisje met en een buisje zonder Menformon het gevormde lysolecithine bereid en op de gebruikelijke wijze getitreerd:

		lysolecithine werkzaam tot in verdunding van:				
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
serum zonder Menformon	na 9 uur		haemolyse			
	op 37° C.	+	—	—	—	—
serum met Menformon	na 18 uur					
	op 37° C.	+	+	—	—	—
idem	na 24 uur					
	op 37° C.	+	+	—	—	—

Wij hebben eveneens onderzocht of het Menformon een dergelijken remmenden invloed had op het phosphatide-splitsend vermogen van het lecithinase uit cobragif. Als cobragif maakten wij gebruik van het „Cobratoxine” van Taguet en Monaelesser in een concentratie van 30 M.E. per $\frac{1}{2}$ c.M³. Het was ons bij voorafgaande experimenten reeds gebleken, dat dit cobra-toxine een vrij sterk phosphatide-splitsende werking had.

Wij hebben dezelfde opstelling gekozen als voor de voorafgaande proef, met dit verschil, dat aan ieder buisje waarin 5 cc serum, nu tevens werd toegevoegd 3 druppels cobratoxine; de hoeveelheid toegevoegd oestron bleef gelijk.

Het resultaat was nu als volgt:

lysolecithine werkzaam tot
in verdunning van:

1/8 1/16 1/32 1/64 1/128 1/256

serum met cobragif zonder

Menformon

3 uur op 37°

..... haemolyse

serum met cobragif met

Menformon

+ — — — — —

idem

6 uur

+ + + + + —
.....
+ + — — — —

idem

9 uur

+ + + + — —
.....
+ + — — — —

idem

12 uur

+ + + + — —
.....
+ + — — — —

idem

18 uur

+ + + + — —
.....
+ + — — — —

idem

24 uur

+ + + + — —
.....
+ — — — — —

Ook de vorming van lysolecithine uit serum met behulp van cobralecithinase wordt dus, volgens onze uitkomsten, in belangrijke mate tegengegaan door „Menformon”. Tevens op grond van later te noemen onderzoeken zijn wij van meening, dat deze werking van het follikelhormoon moet worden toegeschreven aan een remmenden invloed op de vorming van lysolecithine en niet aan een inactivering van het, in normale quantiteiten gevormde.

lysolecithine, zooals dit voor cholesterol waarschijnlijk het geval is. Alleen reeds de geringe hoeveelheid follikelhormoon (in gewichtseenheden uitgedrukt 0.04 mgr. per 100 cc serum), maakt dit laatste uitermate onwaarschijnlijk.

De invloed van oestron op de werking van andere fermenten hebben wij nagegaan om uit te kunnen sluiten dat oestron een universeel ferment-gif is. Wij konden geen remming van de splitsing van organische fosphaat-verbindingen door „zure” of door „alkalische” phosphatase waarnemen na toevoegen van oestron.

De andere in aanmerking komende hormonen, zooals gonadotrope en corpus luteum-hormonen, hebben wij in ons onderzoek niet betrokken, deels omdat het follikelhormoon het meest bekende en bestudeerde hormoon is voor den neonatus, deels omdat de andere genoemde hormonen niet, zooals het Menformon, in waterige oplossing en volkomen zuiver ons ter beschikking stonden. Bovendien zijn er over de werking van follikelhormonen op de bloedsamenstelling talrijke publicaties verschenen, die een duidelijk verband van dit hormoon met de bloedsamenstelling aantoonen, terwijl de andere genoemde hormonen in dit opzicht van veel minder invloed schijnen te zijn.

Behalve door verschillen in hoeveelheid substraat en remmende stoffen wordt de lysolecithine-productie uiteraard eveneens beheerscht door de hoeveelheid ferment, die op het substraat in kan werken. Deze component van de reactie is echter moeilijk te bepalen. Quantitatieve ferment-bepalingen zijn door ons niet verricht; evenzoo was het niet mogelijk door wijzigingen aan te brengen in de hoeveelheid substraat (lecithine, kephaline) ons althans een oppervlakkig oordeel over het lecithinase-gehalte van volwassenen- en pasgeborenenserum te vormen.

Wij hebben ons eenigszins kunnen oriënteren met behulp van de volgende proeven. Zooals Fahraeus en Bergenhem reeds gevonden hadden en naderhand ook door ons bevestigd kon worden, vindt in serum, dat gedurende 1 uur op een temperatuur van 56°C verwarmd is geworden, geen lysolecithine-vorming meer plaats. Door nu geïnactiveerd volwassenen-serum in verschillende verhouding te mengen met niet-geïnactiveerd navelstrengserum, en omgekeerd, meenden wij uit de grootte der lysolecithine-opbrengst uit deze serummengsels eenige conclusie te kunnen trekken aangaande het fermentgehalte der betrokken sera.

De uitkomsten waren als volgt:

complete haemolyse door
lysolecithine tot in verdunning
van:

1.	Normaal volwassenen serum	1/16
2.	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{3}{4} \text{ normaal volwassenen serum} \\ \frac{1}{4} \text{ geïnactiveerd navelstrengserum} \end{array} \right.$	1,16
3.	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{2} \text{ normaal volwassenen serum} \\ \frac{1}{2} \text{ geïnactiveerd navelstrengserum} \end{array} \right.$	1,12
4.	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{4} \text{ normaal volwassenen serum} \\ \frac{3}{4} \text{ geïnactiveerd navelstrengserum} \end{array} \right.$	1/8
5.	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{3}{4} \text{ geïnactiveerd volwassenen serum} \\ \frac{1}{4} \text{ normaal navelstrengserum} \end{array} \right.$	1/12
6.	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{2} \text{ geïnactiveerd volwassenen serum} \\ \frac{1}{2} \text{ normaal navelstrengserum} \end{array} \right.$	1/24
7.	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{4} \text{ geïnactiveerd volwassenen serum} \\ \frac{3}{4} \text{ normaal navelstrengserum} \end{array} \right.$	1/48
8.	normaal navelstrengserum	1/64

Indien men in aanmerking neemt, dat van de mengsels 2 en 5, van 3 en 6 en van 4 en 7 de gehalten aan lipoïeden, hormonen en serumeiwitten onderling gelijk zijn, dan meenen wij uit deze uitkomsten te mogen besluiten, dat in volwassenen-serum een geringer phosphatide-splitsend vermogen aanwezig is dan in pasgeborenen-serum. Echter dringt zich tevens de conclusie op, dat het gehalte aan ferment niet doorslaggevend is, daar bijv. in mengsel no. 4, waar slechts een kwart van de normale ferment-hoeveelheid van volwassenen-serum aanwezig is, toch nog een lysolecithine-opbrengst verkregen wordt, die gelijk staat met de helft van die uit volwassenen-serum, m.a.w., dat waarschijnlijk de bijkomstige factoren, zooals remmende stoffen en hoeveelheid substraat, belangrijker zijn voor de lysolecithine-opbrengst dan het ferment zelf, dat in overmaat aanwezig schijnt te zijn.

Om dit na te gaan hebben wij ook mengsels onderzocht van geïnactiveerd en niet-geïnactiveerd volwassenen-serum:

complete haemolyse door
lysolecithine tot in verdunning
van:

1.	Normaal volwassenen serum	1/16
2.	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{3}{4} \text{ normaal volwassenen serum} \\ \frac{1}{4} \text{ geïnactiveerd volwassenen serum} \end{array} \right.$	1/16
3.	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{2} \text{ normaal volwassenen serum} \\ \frac{1}{2} \text{ geïnactiveerd volwassenen serum} \end{array} \right.$	1/12
4.	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{4} \text{ normaal volwassenen serum} \\ \frac{3}{4} \text{ geïnactiveerd volwassenen serum} \end{array} \right.$	1/4
5.	Geïnactiveerd volwassenen serum	0

Ook uit deze resultaten krijgt men den indruk, dat de totale ferment-hoeveelheid niet beslissend is voor de lysolecithine-opbrengst: doch dat vanaf een zekere ferment-concentratie de remmende factoren (cholesterol) de grootte der lysolecithine-opbrengst bepalen. $\frac{3}{4}$ van de ferment-hoeveelheid is nog in staat een even groote hoeveelheid lysolecithine uit serum te vormen als de totale hoeveelheid. Het betrekkelijk groote verschil, dat in de eerste serie proeven bleek te bestaan tusschen normaal navelstrengserum en 3 deelen van dit serum met 1 deel geïnactiveerd volwassenen-serum, kan mogelijk een verklaring vinden in de toevoeging van een belangrijke hoeveelheid remmende stoffen met het volwassenens serum, i.c. cholesterol.

3. De haemolyse door lysolecithine.

Over de wijze, waarop het lysolecithine aangrijpt op de erythrocyt of op de erythrocyten-membraan is tot nu toe niets bekend geworden. Ook voor de andere meer bekende haemolytica (saponinen) bestaat hierover trouwens evenmin eenige zekerheid (Ponder). Wij hebben hieromtrent geen onderzoekingen verricht; de veronderstelling echter, dat bij de haemolyse door lysolecithine en saponine hun affiniteit tot het cholesterol een belangrijke rol speelt, lijkt ons wel zeer waarschijnlijk.

Ook op bacteriologisch gebied is hiervan een illustratie bekend geworden. Klein en Stone toonden aan, dat pneumococcen

gekweekt in een milieu, waarin vrij cholesterol aanwezig was, door saponine werden opgelost; pneumococcen van een voedingsbodem zonder cholesterol waren ongevoelig voor saponine. Slechts het „vrije cholesterol had deze werking, de veresterde vorm niet. Zij nemen aan, dat het cholesterol, dat de pneumococcus uit den voedingsbodem in zijn kapsel opneemt, als sensibilisator voor het saponine optreedt.

Bij de titratie van lysolecithine viel ons op, dat in de telkamer, waarin het aantal niet gehaemolyseerde erythrocyten werd bepaald, deze erythrocyten steeds alle den bolvorm vertoonden, zoowel in een milieu waarin enkel physiologische zoutsolutie, als in een milieu waar tevens een zekere hoeveelheid verdund serum aanwezig was. Bergenhem en Fåhræus beschouwden deze bolvorm als de oorzaak van de verminderde neiging tot geldrolvorming en als de oorzaak van de afgenomen bezinkingssnelheid der met lysolecithine voorbehandelde erythrocyten.

Deze bolvorm wordt beschouwd als een vóórstadium der haemolyse. In verband met dezen overgang der erythrocyten onder invloed van lysolecithine van den biconcaven in den sphaerischen vorm hebben wij nagegaan of deze „inleiding der haemolyse" ook een wijziging in de osmotische resistentie ten gevolge had. Wij hebben voor deze bepaling gebruik gemaakt van de methode van Brinkman. Hierbij wordt voor de hypotone oplossingen een verdunningsreeks van isotonische Na-phosphaatbuffer gebruikt, waardoor het vervloeierende effect van NaCl op de erythrocyten-membraan vermeden wordt. Brinkman, die van meening is, dat wijzigingen in de osmotische resistentie der erythrocyten hun oorsprong vinden in de lipoïeden van het serum, bepaalt daarom de resistentie van niet gewasschen erythrocyten, welke dus nog een beschermende laag van serum-bestanddeelen, en wel speciaal van lecithine en cholesterol, bezitten; worden de erythrocyten tevoren gewasschen met isotonische phosphaatbuffer, dan worden de lipoïed-invloeden van het serum uitgeschakeld en vindt men voor deze erythrocyten een hoogere osmotische resistentie. Wij hebben deze bevindingen voor menschelijke erythrocyten vele malen herhaald en geheel kunnen bevestigen.

Het leek ons belangrijk om na te gaan, of door het toevoegen van lysolecithine aan een hoeveelheid ongewasschen erythrocyten, de osmotische resistentie van deze verlaagd werd en of deze eigen-

schap naderhand weer verwijderd kon worden door eenige malen wasschen met isotonische fosphaatbuffer.

De uitvoering vond als volgt plaats: 2 cc bloed, onstolbaar gemaakt met liquoïd „Roche", wordt gedurende 5 minuten met matige snelheid gecentrifugeerd en het bovenstaande plasma geheel afgezogen. De erythrocyten worden weer tot het oorspronkelijke volume aangevuld met ± 1 cc half verdunde lysolecithine-oplossing in zoutsolutie. Na 15 minuten staan bij kamertemperatuur worden de erythrocyten weer scherp afgecentrifugeerd en in een reeks buisjes met afdalende concentraties fosphaatbuffer telkens 20 m.m.³ van deze erythrocyten gebracht. (1) De resteerende erythrocyten worden $3 \times$ in isotonische fosphaatbuffer gewasschen en afgecentrifugeerd en vervolgens eveneens telkens 20 m.m.³ hiervan in een tweede reeks fosphaatverduunningen gebracht. (4) Verder zijn onderzocht een reeks met ongewasschen onvoorbehandelde erythrocyten van denzelfden persoon (3) en een reeks van deze onvoorbehandelde erythrocyten $3 \times$ in isotonische fosphaatbuffer gewasschen. (6) De vier reeksen werden gedurende 1 uur in de broedstoof verwarmd op 37° C en daarna bij kamertemperatuur geplaatst gedurende 6 uren, waarna in de bovenstaande heldere vloeistof het Hb-gehalte werd bepaald met behulp van den photometer. Het percentage gehaemolyseerde cellen werd vervolgens in een curve gebracht, waarin op de abscis de concentraties der fosphaatverduunningen zijn aangegeven.

De resultaten waren als volgt (fig. 1 en bijbehorende tabel).

Uit de curven is af te lezen, dat de voorbehandeling met lysolecithine slechts een uiterst geringe vermindering der osmotische resistentie ten gevolge heeft, en dat zoowel van de niet- als van de wel-voorbehandelde erythrocyten de resistentie sterk toeneemt na wasschen in fosphaatbuffer.

Verdubbeling van de concentratie lysolecithine, waarmee de erythrocyten werden voorbehandeld, (2) had, terwijl tijdens de voorbehandeling nog geen haemolyse der erythrocyten viel waar te nemen, een duidelijke vermindering van de osmotische resistentie tengevolge, die ook na wassching in fosphaatbuffer weer sterk toenam (5).

Een andere proef was de volgende. Aan 3 buisjes ieder met 2 cc (van hetzelfde normale) bloed worden respectievelijk geen, 2 en 4 druppels cobra-toxine toegevoegd, en de beide laatste in de broed-

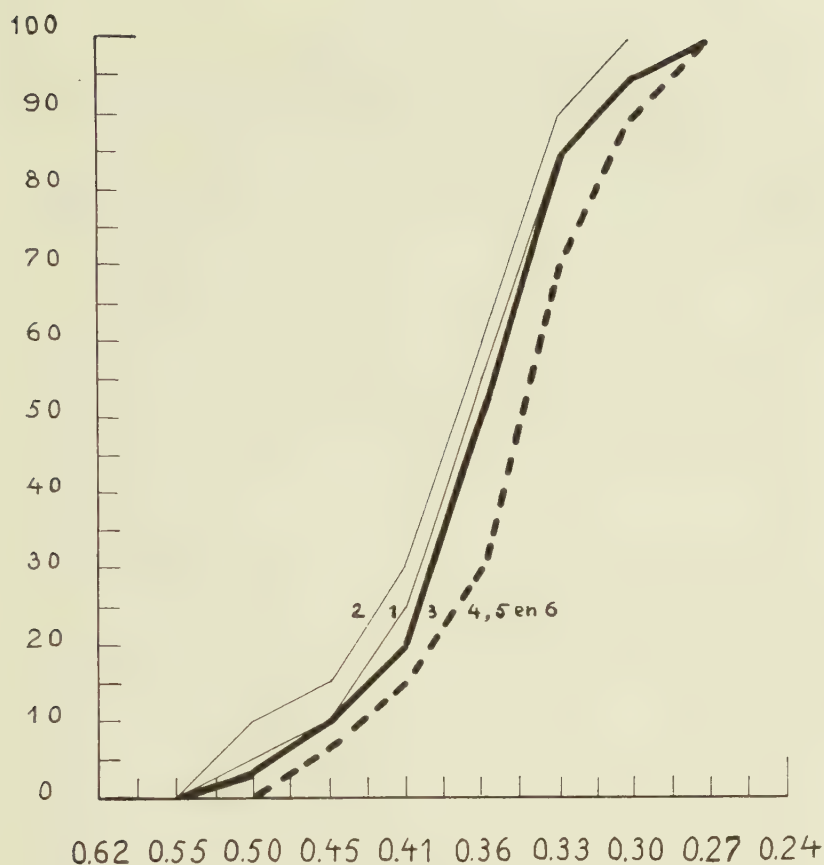


Fig. 1.

TABEL BEHOORENDE BIJ FIGUUR No. 1.

	Verdunning van isotonische fosphaatbuffer;										
	0.62	0.55	0.50	0.45	0.41	0.36	0.33	0.30	0.27	0.24	
1. met lysolecithine voorbehandelde erythrocyten	0	0	5	10	25	55	85	95	100	100	percentage haemolyse
2. met de dubbele hoeveelh. lysolecithine voorbeh. erythrocyten	0	0	10	15	30	60	90	100	100	100	
3. Normale erythrocyten	0	0	4	10	20	50	85	95	100	100	
4. Erythrocyten van 1, naderhand gewasschen in fosphaatbuffer	0	0	0	6	15	30	70	90	100	100	
5. Erythrocyten van 2, naderhand gewasschen in fosphaatbuffer	0	0	0	7	15	35	70	90	100	100	
6. Normale erythrocyten gewasschen in fos- phaatbuffer	0	0	0	5	15	30	70	90	100	100	

stoof gedurende 2 uur tot 37° C verwarmd. Reeds vóór het uitvoeren der osmotische resistentie-bepalingen bleek duidelijk, dat een wijziging in de erythrocyten had plaats gehad: in beide buisjes, waaraan cobra-toxine was toegevoegd, waren de erythrocyten veel minder ver bezonken (stabilisatie) dan in het cobra-vrije, onverwarmde buisje; tevens was een beginnende haemolyse waarneembaar.

De drie buisjes werden gecentrifugeerd en de osmotische resistentie der erythrocyten bepaald.

Daarna werden de resterende erythrocyten 3 × gewassen met isotonische fosphaatbuffer en wederom de osmotische resistentie bepaald (fig. 2). Het bleek, dat voorbehandeling van het

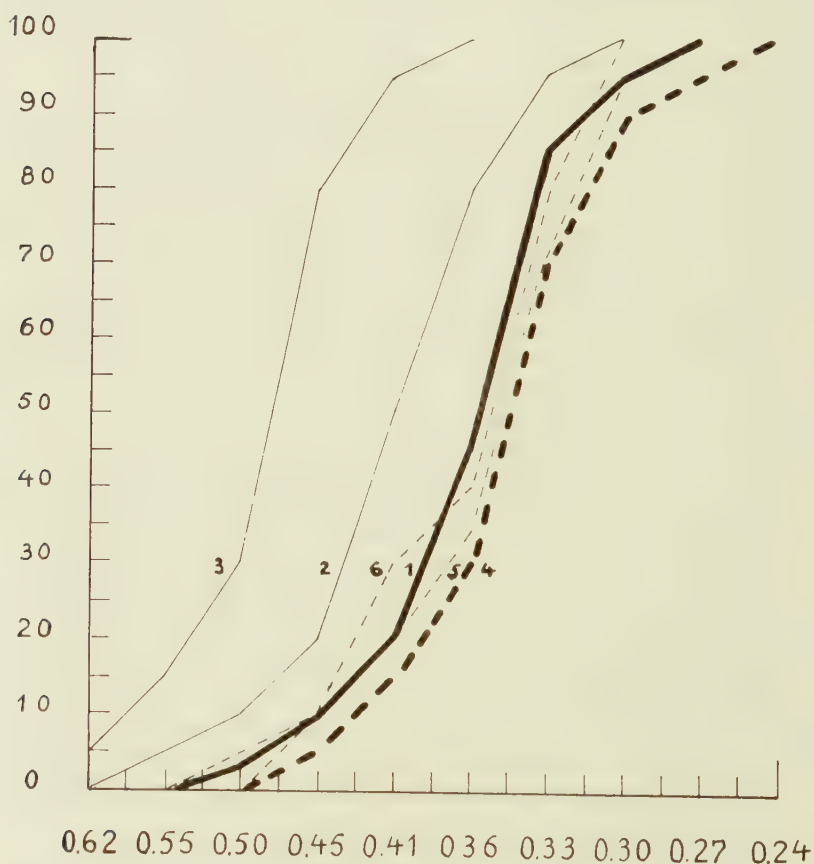


Fig. 2.

TABEL BEHOORENDE BIJ FIGUUR No. 2.

	Verdunning van isotonische fosphaatbuffer:									
	0.62	0.55	0.50	0.45	0.41	0.36	0.33	0.30	0.27	0.24
1. Normale erythrocyten	0	0	3	10	20	45	85	95	100	100
	percentage haemolyse									
2. Na behandeling met cobratoxine	0	5	10	20	50	80	95	100	100	100
3. Na behandeling met de dubbele hoeveelheid cobratoxine	5	15	30	80	95	100	100	100	100	100
4. Erythrocyten van 1, 3 $\times$ in fosphaatbuffer gewassen	0	0	0	5	15	30	70	90	95	100
5. Erythrocyten van 2, 3 $\times$ in fosphaatbuffer gewassen	0	0	0	10	20	35	70	95	100	100
6. Erythrocyten van 3, 3 $\times$ in fosphaatbuffer gewassen	0	0	5	10	30	40	80	100	100	100

bloed met cobratoxine de osmotische resistentie der erythrocyten duidelijk vermindert en dat deze vermindering der resistentie ten deele weer hersteld kan worden door wasschen met fosphaatbuffer. Dat de erythrocyten na het wasschen niet weer hun oorspronkelijke „primaire” resistentie bleken te herkrijgen, kan naar onze meening zijn oorzaak vinden in een te ver voortgeschreden beschadiging der erythrocyten-membraan door het „cobra-lysolecithine”.

Wij hebben met de methode van Brinkman ook nagegaan de resistentie van navelstreng-erythrocyten, vergeleken met die van volwassenen-erythrocyten. (Curven en tabel op volgende pag.)

De curven hiervan geven aan, dat de osmotische resistentie van foetale erythrocyten belangrijk geringer is dan die van volwassenen-bloedlichaampjes, terwijl deze resistentie na wasschen met fosphaatbuffer volkomen gelijk wordt.

Ter bevestiging van de meening van Brinkman, dat de wijziging der osmotische resistentie een gevolg is van seruminvloeden en niet primair zijn oorzaak vindt in eigenschappen der erythrocyten zelf, hebben wij volwassenen-erythrocyten gebracht in navelstrengserum, nadat ze tevoren 3 $\times$ met fosphaatbuffer gewassen waren, en

evenzoo gewassen foetale erythrocyten in volwassenen-serum (beide soorten erythrocyten en sera waren van dezelfde bloedgroep).

De resultaten van deze bewerkingen zijn samengevat in fig. 3.

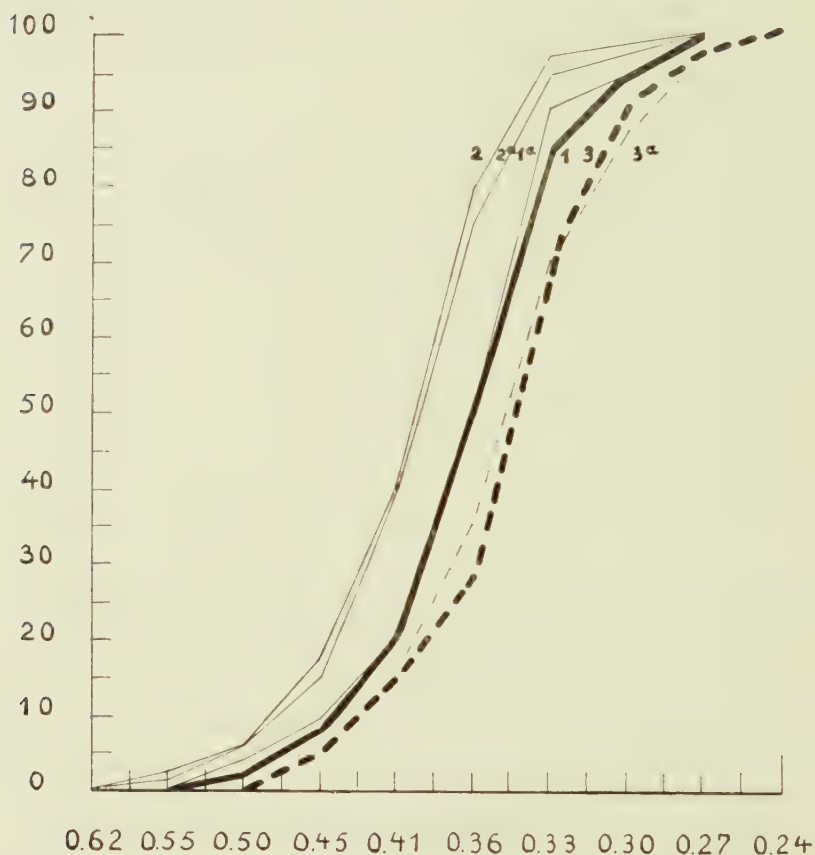


Fig. 3.

Ter wille van de duidelijkheid hebben wij eventueel samenvallende curven als één curve geteekend, de nauwkeurige gegevens zijn in de tabel samengevat.

Het blijkt, dat onder invloed van navelstrengserum de erythrocyten van een volwassene dezelfde osmotische resistentie verkrijgen als de erythrocyten van dit serum en dat foetale bloedlichaampjes door contact met volwassenen-serum een osmotische resistentie gelijk aan die van volwassenen-erythrocyten aannemen. Wij hebben uit deze resultaten dezelfde conclusie getrokken, als waartoe

TABEL BEHOORENDE BIJ FIGUUR No. 3.

	Verdunning van isotonische fosphaatbuffer:										
	0.62	0.55	0.50	0.45	0.41	0.36	0.33	0.30	0.27	0.24	
1. Volwassen erythroc.	0	0	3	9	20	50	85	95	100	100	percentage haemolyse
1a. foetale erythroc. ged. 1 u. in normaal serum gesuspenseerd	0	0	4	10	20	50	90	95	100	100	
2. foetale erythrocyten	0	2	6	17	40	80	97	100	100	100	
2a. normale erythroc. ged. 1 u. in foetaal serum gesuspenseerd	0	1	6	15	40	75	95	100	100	100	
3. in fosphaatbuffer gewasschen volwassen erythroc.	0	0	0	5	15	30	70	90	97	100	
3a. in fosphaatbuffer gewasschen foetale erythrocyten	0	0	0	5	15	35	70	87	97	100	

Brinkman kwam, n.l., dat voor de osmotische resistentie van roode bloedlichaampjes de lipoïeden in het bloedserum een zeer belangrijke beteekenis hebben. Het meest in het oog vallende verschil tusschen beide sera is o.i. namelijk gelegen in het verschil in lipoïed-gehalte (lecithine, cholesterol, lysolecithine).

De uitkomsten van onze onderzoekingen over den invloed van (cobra)-lysolecithine op de osmotische resistentie, en ook de vondst van Brinkman, dat erythrocyten, die de milt gepasseerd zijn een lagere osmotische resistentie bezitten dan te voren, doen ons vermoeden, dat één van de factoren waardoor de resistentie van erythrocyten bepaald wordt, te zoeken is in de lipoïeden en dat deze regeling misschien plaats vindt via het lysolecithine. Het is n.l. niet bekend, dat in vitro door cobratoxine of in vivo in de milt een andere belangrijke wijziging in het bloedplasma optreedt dan de genoemde.

De beteekenis van de osmotische resistentie der erythrocyten voor de intravitale haemolyse lijkt ons echter niet groot. Wij hebben bovengenoemde experimenten hoofdzakelijk uitgevoerd om te trachten eenig verband te vinden tusschen de tot nu toe in de

klinische laboratoria bij haemolytische aandoeningen gebruikelijke onderzoekingsmethoden en de nieuwere opvattingen over het tot stand komen der intravitale haemolyse. Ter illustratie moge nog het volgende dienen:

Wij waren in de gelegenheid, bij een patient met een latenten familiären haemolytischen icterus eenige onderzoekingen uit te voeren. Wij vergeleken de osmotische resistentie van zijn erythrocyten met die van een gezonde volwassene vóór en na wassing van beide in fosphaatbuffer en bepaalden de osmotische resistentie nogmaals, nadat beide soorten erythrocyten tevoren een uur in elkaars plasma gesuspenderd geweest waren.

De curven zijn samengevat in fig. 4. Ook hier blijkt dus weer,

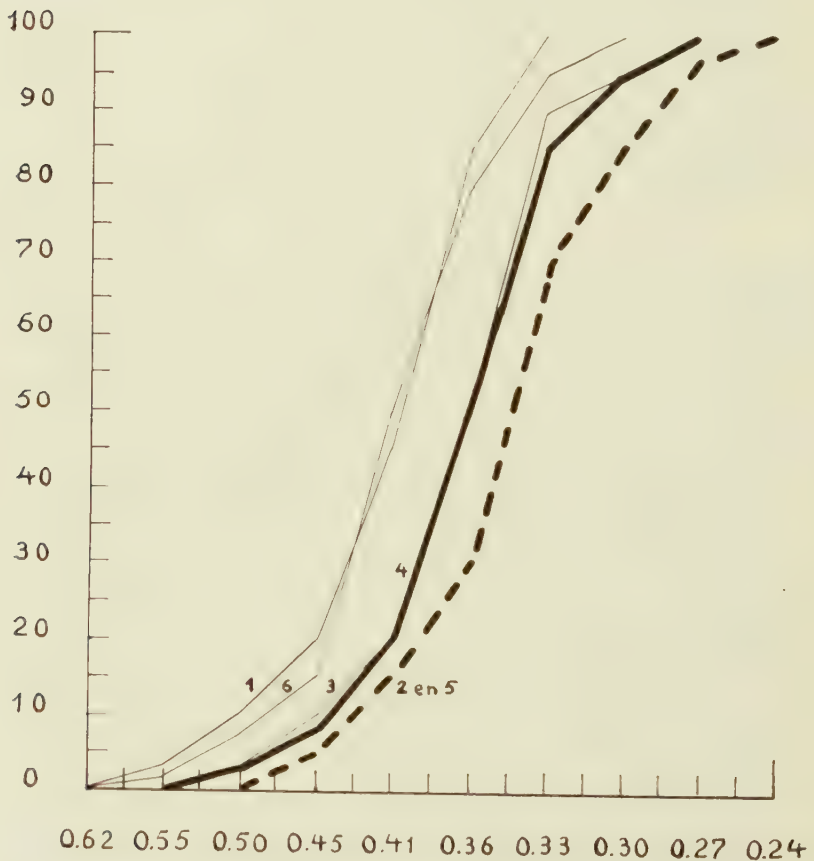


Fig. 4.

TABEL BEHOORENDE BIJ FIGUUR No. 4.

	Verdunning van isotonische phosphaatbuffer;									
	0.62	0.55	0.50	0.45	0.41	0.36	0.33	0.30	0.27	0.24
1. Ongewassen erythroc. v. haemol. icterus patiënt	0	3	10	20	45	85	100	100	100	100
	percentage haemolys.									
2. In phosphaatbuffer ge- wassen erythroc. v. haemol. icterus pat.	0	0	0	5	15	30	70	90	98	100
3. erythroc. v. haemol. ict. patiënt gedurende 1 u. gesuspenderd in normaal serum	0	0	3	10	20	50	90	95	100	100
4. Normale erythrocyten	0	0	3	9	25	50	85	95	100	100
5. Normale erythrocyten gewassen in phosh. buffer	0	0	0	5	15	30	70	90	100	100
6. Normale erythroc. ged. 1 u. gesuspenderd in haemol. ict. serum	0	2	8	15	50	80	95	100	100	100

dat de osmotische resistentie volkomen afhankelijk is van de eigenschappen van het plasma. Wij vonden in het plasma van den patient een afwijkend gehalte aan lipoïeden, n.l. een relatief laag cholesterol-gehalte en een vrijwel normaal lecithine-gehalte (resp. 132 mgr. % en 288 mgr. %).

De resistentie van erythrocyten ten opzichte van lysolecithine is eveneens het onderwerp geweest van enkele onderzoeken. De verwachting lag voor de hand, dat erythrocyten uit serum met een relatief hoog lysolecithine-gehalte een geringere lysolecithine-resistentie zouden bezitten dan die uit normaal serum. Aangezien uit versch. niet verwarmd navelstrengserum een hogere lysolecithine-opbrengst kan worden verkregen dan uit onverwarmd volwassenen-serum, leek het waarschijnlijk, dat foetale erythrocyten een iets geringere resistentie zouden vertoonen dan volwassen-erythrocyten. Er doen zich bij deze resistentie-bepalingen echter eenige speciale moeilijkheden voor. Indien de te gebruiken erythrocyten te voren niet gereinigd worden van plasmaresten dan bestaat

de mogelijkheid, dat de resistentie te hoog wordt gevonden, doordat het nog aanklevende serum het lysolecithine ten deele onwerkzaam maakt (zie invloed van serum op lysolecithine-haemolyse, pag. 51). Worden de erythrocyten wel gewasschen, dan bestaat de kans, dat het lysolecithine, dat zij in vivo reeds hadden opgenomen (geabsorbeerd?), weer wordt weggespoeld. Wij hebben, ten einde deze storende factoren te kunnen vermijden, de volgende kunstgrepen toegepast:

Navelstrengbloed, onstolbaar gemaakt met 0.25 % Na-citraat, wordt met matige snelheid gecentrifugeerd, en het bovenstaande plasma afgepipetteerd. Van de erythrocyten wordt telkens 20 m.m.³ in een reeks lysolecithine-verdunningen gebracht.

Evenzoo worden de erythrocyten van volwassenen-bloed behandeld.

De overige erythrocyten van het navelstrengbloed worden nu 3 x gewasschen met het plasma van het volwassenen-bloed en vervolgens weer telkens 20 m.m.³ in lysolecithineverdunningen gebracht.

Evenzoo wordt een resistentieproef ingezet van de overige volwassenen-erythrocyten gewasschen met navelstrengplasma. Van deze resistentie-bepalingen was het resultaat als volgt:

	lysolecithineverdunningen:					
	1/4	1/6	1/8	1/16	1/32	1/64
uit volwassenen-plasma	100	100	100	100	76	10
volwassenen erythrocyten	percentage haemolyse					
uit navelstrengplasma	100	100	100	100	80	10
uit volwassenen-plasma	100	100	100	100	92	30
navelstrengerythrocyten						
uit navelstrengplasma	100	100	100	100	90	35

Wij krijgen uit bovengenoemde uitkomsten den indruk, dat de foetale erythrocyten iets minder resistent tegen lysolecithine zijn dan volwassenen-erythrocyten. Het verschil is echter zoo gering, dat het de vraag is of hieraan wel een beteekenis mag worden toegekend, als een der factoren, die aan de versterkte bloedafbraak na de geboorte ten grondslag liggen.

De haemolyse door lysolecithine wordt, zooals te verwachten is, in belangrijke mate geremd door toevoeging van kleine hoeveelheden serum. Ponder heeft dit verschijnsel zeer uitgebreid onderzocht voor de saponine-haemolyse. Wij hebben de remming van lysolecithine-haemolyse door serum herhaalde malen nagegaan, vooral om te kunnen vaststellen welk serumbestanddeel speciaal voor deze remming verantwoordelijk is te stellen.

Onze eerste experimenten hielden zich bezig met een vergelijking van de remmende werking van volwassenen- en van navelstrengserum. Beide sera werden steeds gelijktijdig met dezelfde hoeveelheid lysolecithine getest. Tevoren werd het lysolecithine getitreerd op de gebruikelijke wijze en de maximale verdunning bepaald, waarbij nog volledige haemolyse optrad.

De proefopstelling was als volgt:

In een rij buisjes werd het te testen serum in een afdalende verdunning gebracht, b.v. 1/60, 1/70, 1/80, 1/90, etc. Aan ieder buisje werd nu lysolecithine toegevoegd, zoodat de concentratie hiervan in alle buisjes als regel het 4-voudige bedroeg van die, waarbij in de voorproef nog juist complete haemolyse werd gevonden. Aan ieder buisje werden nu gewasschen erythrocyten toegevoegd en het geheel gedurende 1 uur op 37° C verwarmd, waarna in ieder buisje het percentage haemolyse met behulp van den photometer bepaald werd. Reeds dadelijk viel op, dat er tusschen de remming door volwassenen-serum en door navelstrengserum een belangrijk verschil bestond. Het laatst genoemde serum remde de haemolyse belangrijk minder dan het eerste.

De uitslag van een der bepalingen was bijv.:

volwassenenserum: remming tot in een verdunning van 1/120

navelstrengserum: remming tot in een verdunning van 1/60.

Als normaal volwassenen-serum werd vrijwel steeds eigen bloedserum gebruikt.

De verhouding in remmend vermogen van volwassenen- en navelstrengserum werd echter niet steeds zoo gevonden als in bovenstaand voorbeeld; de remming door volwassenen-serum bewoog zich als regel om dezelfde waarden, doch de onderzochte navelstrengsera toonden een remmend vermogen, dat onderling belangrijk wisselde.

Het lag voor de hand, dat we ons hebben afgevraagd, of ook deze remming aan het cholesterol moest worden toegeschreven.

Ponder, die vele onderzoeken verrichtte over de remming der saponinehaemolyse door serum, kent aan het cholesterol geen belangrijke functie toe, doch schrijft het geheele remmend vermogen toe aan de serum-eiwitten.

Wij hebben onze onderzoeken uitgevoerd door het remmend vermogen van navelstrengserum te vergelijken met dat van sera van normale volwassenen en van nephrose-patienten (hooge cholesterolwaarden), en met sera van tusschenliggende cholesterolwaarden door onderlinge menging verkregen.

De inrichting der proeven was overigens volkomen gelijk aan bovengenoemde beschrijving: de eerste serie onderzoeken zijn alle uitgevoerd met hetzelfde lysolecithine; die van de tweede serie met lysolecithine verkregen uit een tweede hoeveelheid serum. De waarden van de remming zijn dus in iedere serie onderling wel vergelijkbaar, doch de series onder elkaar niet geheel. In de eerste serie hebben wij van de onderzochte sera het cholesterolgehalte en het gehalte aan albumine en globuline bepaald, teneinde den invloed van ieder te kunnen beoordeelen. In de tweede serie hebben wij nagegaan of het remmend vermogen ook evenredig was met het gehalte van het serum aan „vrij” cholesterol. Het was ons niet mogelijk veel onderzoeken hierover te verrichten, daar door schaarschte van de petroleum-aether de bepaling van „vrij” en gebonden cholesterol slechts in zeer beperkte mate mogelijk was.

In onderstaande tabellen zijn de uitkomsten van deze proeven samengevat:

	Chol. mgr. ‰	Alb. gr. ‰	glob. gr. ‰	Volledige rem- ming der hae- molyse tot in verdunning van:
Serie I				
a. Navelstrengserum	63	4.3	2.2	1/60
b. Volwassenenserum	240	5.6	2.5	1/120
c. Nephrose-serum (A)	440	2.1	2.4	1/120
d. Nephrose-serum (B)	1450	1.2	2.1	1/200
e. Kunstmatig gemengd serum van 9 dl. a en 1 dl. d	200	4	2.1	1/120
f. Kunstmatig gemengd serum van 1 dl. c. en 1 dl. d	950	1.6	2.3	1/160

Serie II	Chol.gehalte		Volledige rem- ming der hae- molyse tot in verduunning van:
	vrij	totaal	
a. Navelstrengserum	34	64	1/40
b. Volwassenensersum	50	190	1/80
c. Nephrose-serum	380	1360	1/110
d. Kunstmatig gemengd serum van 9 dl. a en 1 dl. c	68	193	1/50

Uit de tabel van de eerste serie onderzoeken is af te lezen, dat het remmend vermogen met het gehalte aan cholesterol toeneemt; vooral ook de uitkomsten met de kunstmatig gemengde sera verkregen, wijzen sterk in deze richting. Echter is de parallel niet volkomen. Bij vergelijking van het normale serum met het nephrose-serum A, blijken deze een zelfde remmend vermogen te bezitten bij een cholesterolgehalte van resp. 240 en 440 mgr. %. In dit geval moeten wij wel aannemen, dat het lage gehalte aan serum-eiwitten, speciaal albumine, voor de relatief geringe remming verantwoordelijk is. De in verhouding geringe remming door het nephrose-serum B, dat een ruim $3 \times$ zoo hoog cholesterolgehalte heeft als nephrose-serum A, kan heel goed zijn verklaring vinden in het zeer lage albumine-gehalte van eerstgenoemd serum (1.2 gr. %).

In serie II, waar behalve de waarden voor het totaal cholesterol ook die van het niet veresterde deel zijn aangegeven, blijkt ook de serumremming vrijwel parallel te gaan met het gehalte aan vrij cholesterol, slechts van serum d valt de remmende werking tegen. Mogelijk, dat ook hier het relatief lage gehalte aan eiwitten het effect van het cholesterol eenigszins nivelleert.

Resumeerend meenen wij te kunnen vaststellen, dat bij de remming der lysolecithine-haemolyse door serum het cholesterol een zeer belangrijke rol speelt en dat daarnaast aan de serum-eiwitten ongetwijfeld ook een beteekenis moet worden toegekend.

Wij hebben eveneens nagegaan of het follikelhormoon op de lysolecithine-haemolyse eenigen invloed heeft. Er werd hiertoe weer gebruikt een oplossing van dit hormoon in water, het „Menformon“. De eerste serie experimenten werd als volgt uitgevoerd: er

werden twee identieke verdunningsreeksen van lysolecithine gemaakt. Aan de eerste werd per buisje 50 M E Menformon toegevoegd (0.5 cc) en aan de tweede reeks buisjes een gelijke hoeveelheid physiologische zoutsolutie. Vervolgens werden de erythrocyten toegevoegd en na verwarming gedurende 1 uur op 37°C in alle buisjes de haemolyse bepaald. De uitslag hiervan was als volgt:

		lysolecithineverdunningen				
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
1.	Lysolecithine zonder Menformon-toevoeging	+	+	+	+	—
2.	Lysolecithine met Menformon-toevoeging	+	+	+	+	—
		haemolyse				

Bij de uitvoering van deze proef viel het ons op, dat de haemolyse in de reeks met Menformon belangrijk sneller optrad dan in de contrôle reeks en tevens, dat de haemolyse in eerstgenoemde reeks iets verder voortschreed. Teneinde dit nader te kunnen vaststellen hebben wij op de vroeger beschreven wijze door het tellen van de resterende erythrocyten het percentage haemolyse zoo nauwkeurig mogelijk bepaald.

De resultaten waren nu als volgt:

		lysolecithineverdunningen						
		1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
1.	Lysolecithine zonder Menformontoevoeging	100	100	100	100	92	31	0
2.	Lysolecithine met Menformontoevoeging	100	100	100	100	100	86	9
		percentage haemolyse						

We hebben ons afgevraagd, of we hier met een tweede eigenschap van het oestron in verband met haemolyse te maken hebben. Het oestron zelf heeft geen haemolytisch vermogen, zooals ons bij contrôleproeven gebleken is. De versnelling van de haemolyse door oestron kan o.i. oorzaak zijn van de verder voortgeschreden haemolyse. Ponder geeft in zijn studie over de saponine-haemolyse diagrammen, waarin de haemolyse door een bepaalde hoeveelheid saponine is afgezet als functie van den tijd.

Hem bleek, dat bij oneindig langen tijd een oneindig kleine hoeveelheid saponine nog complete haemolyse kan brengen van een bepaalde hoeveelheid erythrocyten. Indien wij deze waarneming toepassen op ons bovengenoemd geval, dan is de gevolgtrekking te maken, dat door de versnelling der haemolyse, ook de graad der haemolyse in hoogere verdunningen verder voortgeschreden moet zijn dan in de serie, waar de versnellende invloed van oestron niet aanwezig is. Het lijkt ons waarschijnlijk, op grond van onze experimenten, dat het oestron als katalysator werkt bij de lysolecithine-haemolyse.

Wij hebben ook nagegaan of het oestron een soortgelijken invloed heeft bij aanwezigheid van serum. Wij hebben daartoe den haemolyse-remmenden invloed van serum bepaald met en zonder toevoeging van Menformon.

De resultaten van dit onderzoek waren als volgt:

		Serum-verdunningen								
		1/30	1/35	1/40	1/45	1/50	1/55	1/60	1/65	1/70
Normaal volwassen serum		0	0	0	0	0	0	10	43	100
	percentage haemolyse									
Normaal volwassen serum met per buisje 50 M.E. Menformon		0	0	0	0	0	15	38	78	100

Dus ook hier is een haemolyse-bevorderende werking van oestron aanwezig.

Aan de hand van de bij het experimenteele onderzoek verkregen resultaten kunnen wij ons ongeveer het volgende beeld vormen van de factoren, die bij den neonatus de mate van bloedafbraak beheerschen. De vorming van een intravitaal werkend haemolyticum (lysolecithine) vindt bij den neonatus in sterkere mate plaats dan bij den volwassene. Deze grootere vorming vindt waarschijnlijk zijn oorzaak in de geringere hoeveelheid cholesterol, dat het lysolecithine neutraliseert. De vorming van lysolecithine wordt vóór de geboorte en gedurende de eerste dagen erna tegengegaan door het oestron, dat in deze periode in zeer groote hoeveelheid bij den pasgeborene circuleert.

Het bloedserum van den neonatus heeft door zijn laag gehalte aan cholesterol en tevens door het lagere serumeiwitgehalte een geringer remmend vermogen t.o.v. het lysolecithine. Het cholesterol oefent dus een tweeledige invloed uit: allereerst „neutraliseert” het het lysolecithine bij de vorming en in de tweede plaats remt het naderhand de haemolytische werkzaamheid ervan. Of deze beide invloeden in vivo geheel onafhankelijk van elkaar plaatsvinden, is niet zeker te zeggen. Indien we echter, met Fähræus, aannemen, dat de lysolecithine-vorming voornamelijk in de milt plaatsvindt, waar plasma en erythrocyten gescheiden voorkomen, dan zal het cholesterol in de milt het lysolecithine gedeeltelijk neutraliseeren, en na het weer samengaan van plasma en erythrocyten, oefent het, in het miltvenebloed aanwezige cholesterol een haemolyse-remmende werking uit.

Als factor, die de haemolyse bevordert, moet nog genoemd worden de iets geringere lysolecithine-resistentie der foetale erythrocyten, en tenslotte nog het geringe haemolyse-versnellende effect van oestron.

In de thans volgende pagina's is het verslag opgenomen van de serie onderzoeken bij pasgeborenen, die uitgevoerd werden met de bedoeling om ook in vivo de betekenis der lipoïeden voor de intensiteit der bloedafbraak aan te toonen.

Tweede gedeelte.

Onderzoekingen bij pasgeborenen.

De in het voorgaande genoemde opvattingen over het wezen der versterkte haemolyse bij pasgeborenen hebben wij getracht te toetsen aan gegevens, verzameld bij een systematisch bloedonderzoek van pasgeborenen. Wijzigingen in de bloedsamenstelling in de periode vóór de geboorte zijn buitengewoon moeilijk te beoordeelen. Het eenige gegeven, dat ons hierbij ten dienste staat, is de samenstelling van het navelstrengbloed. Het galkleurstoffengehalte van dit bloed kan ons, indien wij aannemen, dat de bilirubine-uitscheiding door de placenta bij alle normale foetus vrijwel gelijk is, een middel zijn om de intensiteit der bloedafbraak te schatten. De verhouding der

lecithine
lipoïden in het navelstrengserum, d.w.z. $\frac{\text{lecithine}}{\text{vrij cholesterol}}$ hebben

wij als maat voor de intensiteit der lysolecithine-vorming verondersteld, de oestron-invloed daarbij buiten beschouwing gelaten. Deze veronderstelling, dat een toeneming van het lecithine-gehalte van bloedserum de vorming van lysolecithine bevordert, gronden we, behalve op de vorengenoemde experimenten, vooral op de mededeelingen van Brinkman, die in staat was door intraveneuse injecties van lecithine bij het konijn een haemolytische anaemie te veroorzaken; terwijl ook Josephs door intraveneuse injectie van lecithine bij een kind met latente haemolytische anaemie een crisis teweeg kon brengen. Zelf waren we niet in de gelegenheid te controleeren of na lecithine-injectie bij proefdieren de lysolecithine-productie grooter is dan te voren; doch het lijkt ons waarschijnlijk, dat de waargenomen sterke bloedafbraak bij bovengenoemde experimenten tot stand gekomen is via een vergrootte lysolecithine-vorming.

De reden waarom het „vrije” cholesterol in de noemer van het lipoïed-quotient dient te staan, is uit de reeds genoemde uitkomsten der in vitro-proeven zonder meer duidelijk.

In een groot aantal navelstrengsera hebben we bepalingen verricht. Het bilirubinegehalte werd bepaald volgens Malloy en

Evelyn. Wij hebben volstaan met de bepaling van het totale bilirubine-gehalte en geen onderverdeeling in direct of indirect reagerende bilirubine gemaakt. De methodiek was de volgende:

0.2 cc serum wordt met physiologische zoutoplossing aangevuld tot 4 cc en vervolgens gelijkelijk verdeeld over twee buisjes. Bij de eerste 2 cc serumverdunding wordt 0.4 cc Ehrlich's reagens gevoegd en bij de tweede 0.4 cc 0.9 % HCl. Na een kwartier wordt aan beide buisjes 2.4 cc methylalcohol toegevoegd en de intensiteit der ontstane blauw-violetten kleur wordt na 30 minuten afgelezen in den photometer van Pulfrich in een cuvette van 2 c.m. met filter no. S. 57. De extinctie van de blanco-proef, met HCl in plaats van met Ehrlich's reagens, wordt van de gevonden totale extinctie afgetrokken. Het bilirubine-gehalte kan berekend worden met de formule $c = 21.2 \times E$ mgr. %.

Het gehalte aan phosphatiden wordt op de volgende wijze bepaald. In hoofdzaak hebben wij de methode gevolgd, zooals deze door Polano is aangegeven:

5 cc plasma worden in een maatkolf van 50 cc gedruppeld bij 30 cc extractie-vloeistof volgens Bloor (3 deelen aethylalcohol 96 % en 1 deel aether). De inhoud van het kolpje wordt in een waterbad even opgekookt en na afkoeling aangevuld tot 50 cc met het alcohol-aether-mengsel. De inhoud wordt gefiltreerd, waarbij de trechter wordt afgedekt met een horlogeglas om verdampen te voorkomen. Van het verkregen heldere filtraat wordt in 2×10 cc het phosphorlipoïed-gehalte als volgt bepaald:

In een wijde buis van Jena-glas wordt 10 cc filtraat gebracht en in een waterbad langzaam droog gedampt. Aan het achterblijvende neerslag van vetten wordt 1 cc sterk zwavelzuur, 2—3 cc perhydrol en enkele glazen kraaltjes toegevoegd en op een klein gasvlammetje zoolang verhit, tot er zware witte zwavelzuurdampen gaan ontwijken. Indien op dit moment nog geen volledige verassching heeft plaats gevonden moet nogmaals 1—2 cc perhydrol worden toegevoegd en weer worden verhit tot zwavelzuurdampen ontwijken. Na afkoeling wordt aan de asch, die dan is opgelost in 1 cc zwavelzuur, 9 cc gedestilleerd water, 2 cc molybdaanreagens, 6 cc 20 % natriumsulfiet en 1 cc 1 % hydrochinon toegevoegd.

In een andere buis worden bij elkaar gebracht: 5 cc standaard P-oplossing, 1 cc sterk zwavelzuur en 4 cc water. Hieraan voegt men de reagentia in dezelfde hoeveelheid toe. Standaarden en

monsters worden dan gedurende een half uur in een waterbad gekookt te zamen met een blanco-bepaling, die alleen water, zwavelzuur en de reagentia bevat.

Na afloop van het koken worden de buizen gekoeld, de inhoud quantitatief overgespoeld in gegradueerde reageerbuizen en met gedestilleerd water aangevuld tot 20 cc. In afwijking van de methode door Polano aangegeven, hebben wij daarna de verkregen kleuren onderling vergeleken met behulp van een Hellige-dompelcolorimeter. Wij berekenden het lecithine-gehalte door de gevonden waarde voor het organisch P te vermenigvuldigen met 25.

De gebruikte reagentia waren:

standaard P-oplossing: 0.439 gr. primair kaliumphosfaat opgelost in 1000 cc gedestilleerd water. Deze oplossing wordt vóór het gebruik $10 \times$ verdund en bevat dus per cc 0.10 mgr. P.

zwavelzuur: Acid. sulfur. p.a. 1.84 (Schering en Kahlbaum).

molybdaen reagens: 5 gr. ammonium molybdaenicum p.a.
5 cc sterk zwavelzuur;
gedestilleerd water tot 100 cc.

hydrochinon reagens: 1 gr. hydrochinon p.a.
eenige druppels sterk zwavelzuur;
gedestilleerd water tot 100 cc.

sulfiet oplossing: 20 gr. natriumsulfiet cryst.
gedestilleerd water tot 100 cc.

perhydrol: perhydrol p.a. Merck.

Het cholesterol werd bepaald op de volgende wijze:

1 cc plasma wordt langzaam gedruppeld bij 30 cc alcohol-aethermengsel en na verhitting aangevuld tot 50 cc en gefiltreerd.

10 cc van het filtraat wordt in een glazen schaalte op een waterbad droog gedampt en het achterblijvende neerslag $2 \times$ geëxtraheerd met chloroform. De laatste portie chloroform wordt tot minder dan de helft ingedampt, quantitatief overgespoeld in een standcylindertje van 10 cc en met chloroform aangevuld tot 5 cc. Vervolgens wordt toegevoegd 2 cc azijnzuuranhydride en 0.1 cc sterk zwavelzuur. Het met een stop afgesloten maatcylindertje wordt in het donker geplaatst bij kamertemperatuur. Na een half uur wordt

de kleur-intensiteit gemeten in een Pullfrich-photometer met behulp van filter S. 61.

Het gehalte aan cholesterol kan dan berekend worden uit de formule $c = 780 E \text{ mgr. } \%$. Door de schaarschte van de petroleum-aether waren wij niet in staat steeds het vrije en gebonden cholesterol afzonderlijk te bepalen.

De bovengenoemde bepalingen werden verricht bij een vijftigtal monsters navelstrengbloed, met de bedoeling om na te gaan, of er verband aanwezig is tusschen het galkleurstoffen-gehalte (bloedaafbraak-intensiteit) en het lipoïed-quotient. Het L.Q. werd door ons als volgt berekend. Wij namen aan, dat als bron van organisch phosphor slechts het lecithine in aanmerking kwam en berekenden het lecithine-gehalte door de gevonden waarde voor het organisch P met 25 te vermenigvuldigen. Aangezien van het aanwezige cholesterol slechts het niet gebonden deel in aanmerking komt voor een anti-haemolytische werkzaamheid hebben wij, aan de hand van de resultaten van anderen, een schatting gedaan van het „vrije” cholesterol-gehalte. Sperry, die de meest nauwkeurige bepalingen heeft verricht, vond, dat bij pasgeborenen 40%—60% van het totaal cholesterol-gehalte in veresterden vorm aanwezig is.

Wij hebben voor onze berekening het gemiddelde van 50 % aangenomen.

Indien wij de op deze wijze gevonden waarden voor het L.Q., ($\frac{\text{lecithine}}{\text{vrij cholesterol}}$) afzetten tegen het totale bilirubinegehalte, dan blijkt, dat met de toeneming van het L.Q. ook het galkleurstoffengehalte stijgt: m.a.w. naar mate het lecithine sterker overweegt boven het vrije cholesterol, neemt de bloedaafbraak toe. (fig. 5 en tabel).

De parallel tusschen L.Q. en bilirubinegehalte is meer uitgesproken dan die, welke bestaat tusschen „vrij” cholesterol en bilirubinegehalte, alhoewel door het betrekkelijk weinig varieerende lecithinegehalte, in onze gevallen het L.Q. hoofdzakelijk bepaald wordt door den noemer (fig. 6 en tabel).

Wij waren in de gelegenheid op de verloskundige afdeeling van het Academisch Ziekenhuis dertig pasgeborenen gedurende de eerste tien levensdagen te onderzoeken en bij hen na te gaan hoe

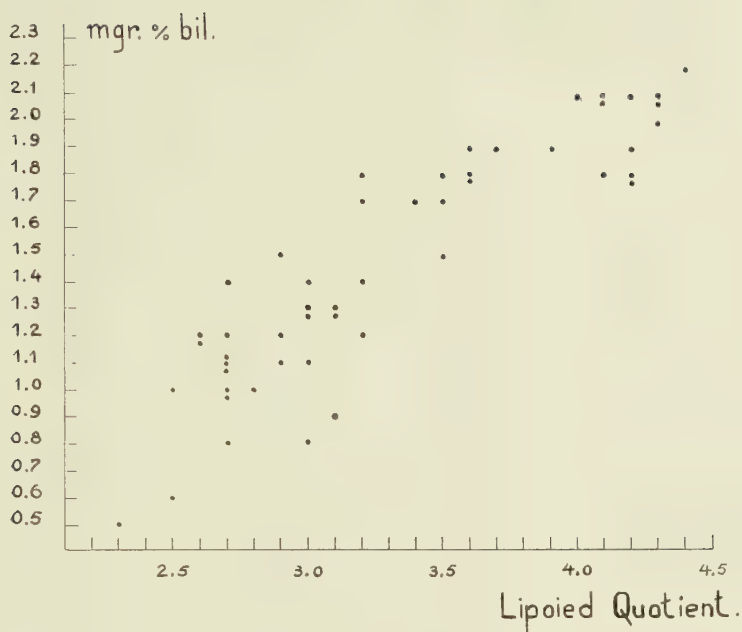


Fig. 5.

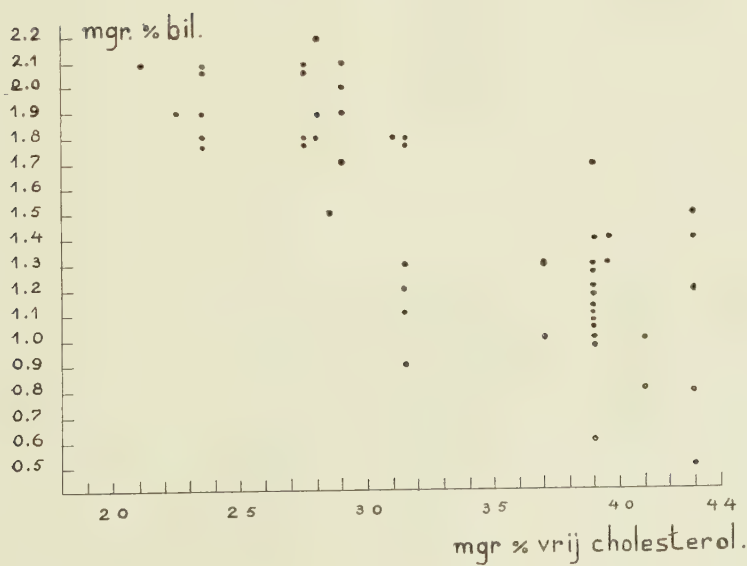


Fig. 6.

TABEL BEHOORENDE BIJ FIGUUR No. 5 EN No. 6.

	Lec.	Chol.	Bil. (totaal)	Lecithine vrij cholesterol
1.	105	78	1.0	2.7
2.	115	78	1.1	2.9
3.	105	55	1.8	3.6
4.	100	63	1.3	3.1
5.	120	86	1.2	2.7
6.	105	78	1.1	2.7
7.	110	55	2.1	4.0
8.	120	86	1.4	2.7
9.	115	63	1.8	3.6
10.	100	78	1.0	2.5
11.	95	63	1.1	3.0
12.	100	47	1.8	4.2
13.	105	55	1.9	3.6
14.	110	63	1.8	3.5
15.	115	55	2.1	4.1
16.	100	78	0.6	2.5
17.	125	86	1.5	2.9
18.	115	55	1.8	4.1
19.	105	78	1.1	2.7
20.	100	63	0.9	3.1
21.	100	57	1.5	3.5
22.	115	82	1.0	2.8
23.	125	79	1.4	3.2
24.	100	47	1.9	4.2
25.	115	78	1.4	3.0
26.	100	56	1.8	3.5
27.	115	58	1.9	3.9
28.	125	58	2.0	4.3
29.	100	63	1.2	3.2

	Lec.	Chol.	Bil. (totaal)	Lecithine
				vrij cholesterol
30.	115	74	1.3	3.1
31.	100	74	1.0	2.7
32.	125	58	2.1	4.3
33.	100	58	1.7	3.4
34.	125	82	0.8	3.0
35.	115	47	2.1	4.3
36.	100	78	1.2	2.6
37.	115	56	2.1	4.1
38.	115	79	1.3	2.9
39.	100	62	1.8	3.2
40.	100	47	1.8	4.2
41.	105	78	1.1	2.7
42.	125	78	1.7	3.2
43.	115	86	0.8	2.7
44.	100	47	2.1	4.2
45.	100	78	1.2	2.6
46.	105	56	1.9	3.7
47.	115	78	1.3	3.0
48.	125	56	2.2	4.4
49.	100	86	0.5	2.3
50.	115	78	1.3	3.0

de cijfers van galkleurstoffengehalte en lipoiedgehalte in het bloed zich in die periode wijzigden. Bij deze 30 kinderen hebben we tevens het verloop van Hb-gehalte nagegaan (zie tabel pag. 65).

Een tweede serie van 10 pasgeborenen van de Verloskundige Kliniek kreeg gedurende het eerste etmaal 3×10.000 ME Menformon intramusculaire toegediend. Hierna werden bij hen de genoemde bloedwaarden en het reticulocyten-getal gedurende 10 dagen nagegaan (zie tabel pag. 71).

Behalve navelstrengbloed is bij beide series onderzocht het bloed

op den 2en, 4en, 6en en 9en levensdag. Na een prik met een vacinostyle in den tevoren goed warm gemaakten hiel vingen wij het bloed op in een eenigszins gewijzigde Wright's pipet, waarin enkele korreltjes poedervormig Na-oxalaat waren gebracht. Als regel vloeiende het bloed snel naar binnen en bleef door het intuschen oplossende Na-oxalaat in vloeibaren toestand. De pipet werd vervolgens aan een zijde dicht gesmolten en 't aldus ontstane buisje, door wattenproppen gesteund, in een centrifuge-buis gebracht. 10 minuten snel centrifugeeren deed de erythrocyten gemakkelijk bezinken en in het bovenstaande plasma werden de noodige bepalingen verricht. Het was ons niet mogelijk met deze betrekkelijk geringe hoeveelheid bloed ook betrouwbare bepalingen van het organisch P-gehalte uit te voeren; enkel het cholesterol, dus de noemer van het L.Q., stond ons als vergelijkingsobject ten dienste.

De bepaling van het Hb-gehalte vond als volgt plaats: uit den zelfden hielprik wordt in een Sahli-pipet 20 m.m.³ bloed opgezogen en uitgeblazen in 5 cc 0.4 % NH_4OH . De verkregen Hb-oplossing wordt met een korreltje natrium-hydrosulfiet gereduceerd en in den Pullfrich-photometer de extinctie bepaald met filter S. 57. Het Hb-gehalte kan dan berekend worden uit de formule $c = \frac{E}{22.5}$ E gr. %.

Deze methode heeft het voordeel, dat door de keuze van het filter (geel-bruin) geen hinder wordt ondervonden van aanwezige galkleurstoffen, hetgeen bij de normaal gebruikelijke Hb-meters, waar Hb door middel van HCl wordt omgezet in bruin haematine, wel het geval kan zijn.

De reticulocyten werden bepaald volgens de methode van Heilmeyer. Enkele, 4—5 dr., bloed worden opgevangen in een buisje gevuld met physiologische zoutsolutie, waaraan eenig Na-oxalaat is toegevoegd om stolling te voorkomen; in deze physiologische zoutsolutie is tevens opgelost brillantcresyl-blauw, in zoodanige hoeveelheid dat een intensief blauwe kleur ontstaat. Na menging van kleurstof en bloed wordt het buisje een uur lang weggezet en daarna langzaam gecentrifugeerd, waarna van het sediment een uitsrijkpraeparaat wordt gemaakt. Dit praeparaat kan direct na het drogen bekeken worden of te voren nog op de gebruikelijke wijze volgens May Grünwald-Giemsa worden gekleurd. Wij bepaalden in ieder praeparaat het aantal reticulocyten, dat op 1000 erythrocyten voorkwam.

Bij 30 gezonde pasgeborenen gingen wij aldus het verloop van Hb, bilirubine, cholesterol in het bloed na.

De uitkomsten waren als volgt:

		Navelstreng-				
	No.	bloed	2e dag	4e dag	6e dag	9e dag
Hb.	1	25.1	—	25.5	22.2	18.0
Cholesterol		78	—	127	156	148
Bilirubine		1.47	—	2.5	1.6	0.3
Hb.	2	24.0	22.3	21.5	18.9	18.7
Chol.		82	94	86	101	109
Bil.		0.63	2.1	0.7	0.42	0.31
Hb.	3	23.8	22.3	19.8	18.9	18.6
Chol		58	62	94	109	117
Bil.		1.47	3.2	2.5	0.63	0.31
Hb.	4	22.4	19.8	18.1	18.0	17.7
Chol.		99	94	111	125	109
Bil.		1.26	1.68	1.05	0.2	0.63
Hb.	5	26.0	25.5	23.1	18.1	17.6
Chol.		58	64	67	78	93
Bil.		1.68	4.6	6.3	2.7	3.4
Hb.	6	17.8	16.1	14.9	13.9	13.8
Chol.		74	94	109	—	117
Bil.		1.05	1.05	1.15	—	0.82
Hb.	7	24.3	22.6	18.9	17.9	17.1
Chol.		62	48	101	83	91
Bil.		1.68	4.0	9.2	9.0	4.0
Hb.	8	22.1	20.5	18.0	17.8	17.5
Chol.		78	70	93	109	123
Bil.		1.05	2.2	2.1	1.6	0.8

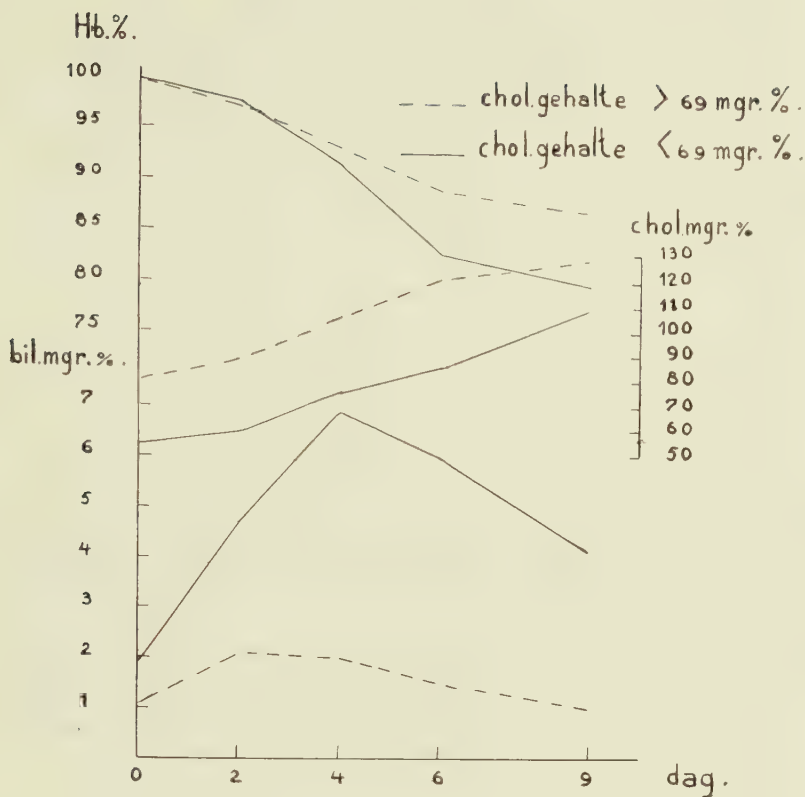
		Navelstreng-					
		No.	bloed	2e dag	4e dag	6e dag	9e dag
Hb.	9		23.8	22.6	21.3	21.1	20.9
Chol.			78	94	101	109	131
Bil.			0.84	2.1	1.63	0.21	0.2
Hb.	10		23.4	21.8	19.7	18.8	17.9
Chol.			47	55	62	71	93
Bil.			2.1	8.6	8.4	5.7	2.3
Hb.	11		18.2	18.4	16.8	15.4	15.1
Chol.			74	83	109	117	124
Bil.			1.05	1.0	1.7	1.9	0.8
Hb.	12		22.1	22.2	20.1	19.2	18.6
Chol.			58	62	94	109	117
Bil.			2.1	3.6	4.8	5.1	3.8
Hb.	13		26	25.5	22.2	18.1	17.4
Chol.			58	64	67	78	93
Bil.			1.7	4.8	6.4	3.9	3.6
Hb.	14		24.0	23.8	21.6	20.0	19.8
Chol.			82	93	109	117	125
Bil.			0.8	1.2	1.4	1.2	1.0
Hb.	15		23.4	22.9	20.2	18.4	17.6
Chol.			47	55	62	71	83
Bil.			2.1	6.8	8.2	5.7	5.4
Hb.	16		22.4	22.6	20.2	18.9	18.4
Chol.			78	83	93	109	117
Bil.			1.2	2.2	2.1	1.6	0.9
Hb.	17		16.4	16.8	15.2	14.5	13.6
Chol.			56	62	71	83	109
Bil.			2.1	4.6	6.9	9.4	6.4
Hb.	18		20.3	20.6	19.4	18.7	17.9
Chol.			79	83	91	109	117
Bil.			1.3	3.1	4.2	4.4	3.0

Navelstreng-						
	No.	bloed	2e dag	4e dag	6e dag	9e dag
Hb.		22.3	22.0	20.4	19.5	19.0
Chol.	19	62	70	86	93	101
Bil.		1.8	3.6	4.3	5.2	3.6
Hb.		20.6	20.2	19.3	17.2	16.5
Chol.	20	47	51	63	71	79
Bil.		1.8	4.6	9.7	10.5	8.3
Hb.		18.2	18.4	18.2	18.0	17.9
Chol.	21	78	86	101	109	131
Bil.		1.1	2.2	2.4	2.0	1.6
Hb.		20.6	20.8	20.6	20.1	19.6
Chol.	22	78	94	131	148	148
Bil.		1.7	2.0	1.8	1.2	0.9
Hb.		19.4	19.8	19.8	19.4	19.0
Chol.	23	86	101	109	131	148
Bil.		0.8	1.2	1.3	1.0	0.6
Hb.		18.6	18.6	18.2	17.6	17.2
Chol.	24	47	58	78	76	127
Bil.		2.1	3.8	6.9	4.4	3.2
Hb.		19.2	19.8	20.2	19.6	19.2
Chol.	25	78	86	109	127	148
Bil.		1.2	1.8	2.4	2.0	0.9
Hb.		19.4	19.2	19.0	18.2	17.8
Chol.	26	56	63	86	94	101
Bil.		1.9	3.6	5.4	6.8	4.2
Hb.		17.6	18.2	17.8	17.4	17.2
Chol.	27	78	86	109	127	131
Bil.		1.3	2.3	3.4	2.1	1.2
Hb.		24.0	24.4	23.2	22.6	21.8
Chol.	28	56	64	78	86	86
Bil.		2.2	4.8	9.6	9.2	5.4

Navelstreng-						
	No.	bloed	2e dag	4e dag	6e dag	9e dag
Hb.		20.4	20.4	20.2	19.9	19.7
Chol.	29	86	86	94	109	127
Bil.		0.5	2.3	2.8	2.0	1.6
Hb.		16.4	16.8	16.4	16.2	15.9
Chol.	30	78	86	109	117	131
Bil.		1.3	1.8	2.6	0.8	0.2

Deze tamelijk onoverzichtelijke gegevens kunnen wellicht het beste op de volgende wijze ingedeeld worden. Het gemiddelde cholesterol-gehalte in het navelstrengbloed van deze reeks pasgeborenen is 69 mgr. $\%$. Brengen wij in één groep alle gevallen met een cholesterol-gehalte, dat boven het gemiddelde ligt, en in een tweede groep, die pasgeborenen met lagere cholesterol-waarden in het bloed, dan kunnen we van iedere groep de gemiddelde bilirubine-waarden van de opeenvolgende dagen in een curve brengen (fig. 7 en tabel). Het blijkt, dat bij pasgeborenen met een laag cholesterol-gehalte in het navelstrengbloed de galkleurstoffen reeds bij de geboorte in grootere hoeveelheid in het navelstrengbloed voorkomen dan bij de andere groep (zooals ook reeds op pag. 60 is vermeld), doch tevens ontstaat er gedurende de eerste levensweek bij deze groep een duidelijk sterkere bilirubinaemie dan bij de overige onderzochte pasgeborenen. Zooals in de bijgevoegde tabel vermeld, zijn de gevonden verschillen tusschen beide groepen statistisch significant.

Ook het verloop van het Hb-gehalte van het bloed hebben wij in dezelfde graphiek aangeteekend. Het Hb-gehalte bij de geboorte bedroeg voor de cholesterol-rijke groep 20.7 gr. $\%$, voor de andere 22.3 gr. $\%$. Deze aanvangswaarden hebben we voor iedere groep op 100 $\%$ gesteld en het Hb-gehalte op de daarop volgende dagen uitgedrukt in procenten van deze aanvangswaarden. Bij de eerste groep bedroeg de gemiddelde vermindering van het Hb-gehalte 13.1 $\%$ en bij de overigen 20.7 $\%$. Dit verschil is naar onze meening te gering, dan dat we er beteekenis aan mogen toekennen, temeer omdat het aantal waarnemingen betrekkelijk klein is geweest.



Verloop van Hb., bil. en chol. bij 30 pasgeborenen.

Fig. 7.

Gemiddelde bilirubine-waarden van groep I en II gedurende de eerste levensdagen:

	groep I chol. > 69 mgr. %	groep II chol. < 69 mgr. %	σ diff.
Navelstrengbloed	1.1 ($\pm$ 0.3)	1.9 ($\pm$ 0.11)	$\pm$ 0.09
2de dag	2.1 ($\pm$ 0.6)	4.7 ($\pm$ 1.43)	$\pm$ 0.42
4e dag	2.0 ($\pm$ 0.86)	6.8 ($\pm$ 2.19)	$\pm$ 0.69
6e dag	1.5 ($\pm$ 0.97)	6.0 ($\pm$ 2.72)	$\pm$ 0.79
9e dag	1.0 ($\pm$ 0.66)	4.1 ($\pm$ 1.88)	$\pm$ 0.54

Gemiddelde Hb.-waarden van groep I en II gedurende de eerste levensdagen:

	groep I chol. > 69 mgr. %	groep II chol. < 69 mgr. %	σdiff.
Navelstrengbloed	100	100	
2e dag	97.0 (± 4.7)	97.3 (± 2.8)	± 1.4
4e dag	93.7 (± 6.7)	89.2 (± 5.6)	± 2.2
6e dag	89.3 (± 8.2)	82.5 (± 7.7)	± 2.9
9e dag	86.9 (± 9.2)	79.3 (± 7.3)	± 3.0

Ook statistisch zijn de verschillen tusschen beide groepen niet significant.

In dezelfde graphiek is tevens nog aangegeven de toeneming van het cholesterol-gehalte gedurende de eerste levensdagen. Hieruit blijkt, dat het verschil in cholesterol-gehalte, dat bij de geboorte bestaat, na tien dagen nog vrijwel onveranderd aanwezig is. De totale toeneming bedraagt bij de groep met de lage aanvangswaarden + 80 % van de beginwaarde; bij de groep met een hoog cholesterol-gehalte in het navelstrengbloed is de toeneming, zoowel relatief (± 60 %) als absoluut, geringer.

Nadat wij ons aldus een oordeel hadden kunnen vormen over de relatie tusschen cholesterol en galkleurstoffen bij pasgeborenen, waren wij daarna nog in de gelegenheid de invloed van follikelhormoon op de bilirubinaemie en bloedafbraak na te gaan.

Aan tien pasgeborenen werden gedurende het eerste etmaal 3 · 10.000 ME Menformon intramusculair toegediend en bij hen werden, op dezelfde wijze als bij de eerste groep, bepalingen verricht (pag. 71). Het viel ons op, dat de met follikelhormoon behandelde pasgeborenen tijdens de observatie-periode, even goed als de onbehandelde kinderen, een zichtbare icterus kunnen vertoonen. Ook uit de gevonden bilirubine-waarden blijkt dit zeer duidelijk. Wij hebben er van afgezien om ook van deze groep de gemiddelde cholesterol- en galkleurstoffen-gehalten graphisch weer te geven, daar het aantal gevallen daarvoor te gering was en tevens, omdat de gevonden waarden onderling sterke variaties vertoonden, vooral in het tijdstip waarop de sterkste bilirubinaemie optrad.

Indien wij de verschillende gevallen elk voor zich in oogen-
schouw nemen, dan krijgen wij den indruk, dat na toediening van
Menformon de periode, waarin de hoogste bilirubine-waarden in het
bloed worden gevonden, later valt dan bij de vroeger genoemde
pasgeborenen (b.v. no. I, II, IV en VIII). Bij enkelen kun-
nen wij tevens opmerken, dat de bilirubinaemie in twee fasen ver-
loopt (no. III, VI, VII en VIII). Bij de overigen onderscheidt het
verloopt zich niet noemenswaard van dat bij onbehandelde pas-
geborenen.

Als meest opvallend verschijnsel trof ons echter het feit, dat het
verband tusschen cholesterol en bilirubine, dat bij de onbehandelde
groep zoo duidelijk was, hier in het geheel niet te ontdekken valt.
Daar o.i. het cholesterol-gehalte niet alleen beslissend is voor de
intensiteit der bloedaafbraak, lag het voor de hand om tevens het
verloop van het lecithine-gehalte na te gaan. De betrekkelijk groote
hoeveelheid bloed, die voor deze bepaling noodig is, maakte het
bezwaarlijk het onderzoek bij deze pasgeborenen hiermee te com-
pleteeren.

Verloop van Hb, Cholesterol, Bilirubine, Reticulocyten bij
10 gezonde pasgeborenen na toediening van 3×10.000 M E
Menformon gedurende de eerste 24 uur.

	Navelstreng- bloed	2e dag	4e dag	6e dag	9e dag
I					
Hb.	18.4	18.8	18.5	18.2	17.8
Chol.	57	63	71	93	109
Lec.	100	—	—	—	—
Bil.	1.5	1.7	2.1	4.3	4.6
Retic.	34	40	46	40	30
II					
Hb.	24.0	24.6	24.8	24.2	23.6
Chol.	82	91	101	109	117
Lec.	115	—	—	—	—
Bil.	1.0	1.2	1.4	2.4	3.6
Retic.	26	38	46	52	38

	Navelstreng- bloed	2e dag	4e dag	6e dag	9e dag
III					
Hb.	20.4	20.9	21.9	20.8	19.9
Chol.	79	83	91	109	117
Lec.	125	—	—	—	—
Bil.	1.4	3.8	3.2	1.6	2.9
Retic.	34	46	54	40	26
IV					
Hb.	20.6	20.6	20.4	18.4	17.9
Chol.	47	51	63	71	83
Lec.	100	—	—	—	—
Bil.	1.9	3.2	3.4	6.9	9.7
Retic.	58	50	38	27	30
V					
Hb.	23.5	24.0	24.2	23.8	23.2
Chol.	78	83	91	109	117
Lec.	115	—	—	—	—
Bil.	1.4	1.5	3.3	5.1	4.0
Retic.	32	46	52	54	48
VI					
Hb.	16.5	17.2	17.9	17.4	17.0
Chol.	56	63	71	93	109
Lec.	100	—	—	—	—
Bil.	1.8	4.2	2.9	3.8	4.6
Retic.	38	42	55	50	52
VII					
Hb.	22.1	22.1	22.4	21.9	21.5
Chol.	58	62	83	109	117
Lec.	115	—	—	—	—
Bil.	1.9	3.1	3.6	3.0	3.2
Retic.	63	56	65	60	42

	Navelstreng- bloed	2e dag	4e dag	6e dag	9e dag
VIII					
Hb.	25.5	26.2	27.0	26.6	26.1
Chol.	58	63	71	83	109
Lec.	125	—	—	—	—
Bil.	2.0	3.2	2.6	4.6	5.3
Retic.	80	75	88	94	86
IX					
Hb.	14.6	15.4	16.2	16.0	15.7
Chol.	63	71	79	93	117
Lec.	100	—	—	—	—
Bil.	1.2	1.9	2.2	3.0	2.1
Retic.	20	31	45	50	62
X					
Hb.	18.2	18.8	19.0	18.6	18.0
Chol.	74	83	91	101	117
Lec.	115	—	—	—	—
Bil.	1.3	1.2	1.4	1.9	1.3
Retic.	31	43	40	44	38

Verschillende onderzoekers hebben er op gewezen, dat snelle groei van weefsels als regel samengaat met een overwegen van lecithine over het cholesterol (zie o.a. Brinkman, Degkwitz). Van het follikelhormoon is bekend, dat het stimuleerend werkt op de groei van weefsels der geslachtsorganen (b.v. vaginaal epitheel) en op het beenmerg (Feuchtinger). Wij hebben bij de serie pasgeborenen, die Menformon-injecties gekregen hadden, het reticulocyten-getal nagegaan en dit vergeleken met de waarden, die we bij een gelijk aantal niet voorbehandelde neonati konden verkrijgen.

De gemiddelden voor beide groepen waren de volgende:

	navelstr.					
	bloed	2e dag	4e dag	6e dag	9e dag	
normale pasgeborenen	40	36	20	8	4	‰ reticulocyten
met Menformon behandelde pasgeborenen	38	44	50	48	42	‰ reticulocyten

Uit deze getallen meenen wij te mogen besluiten, dat het follikel-hormoon bij neonati een stimuleerende invloed heeft op de vorming van erythrocyten in het beenmerg. Ook aan het verloop van het Hb-gehalte van beide groepen kunnen wij deze versterkte bloed-vorming waarnemen. Het Hb-gehalte is echter ook afhankelijk van de mate van bloedafbraak en daardoor niet een zoo zuiver verge-lijkingsobject.

De gemiddelden voor beide groepen waren:

	navelstr.					
	bloed	2e dag	4e dag	6e dag	9e dag	
normale pasgeborenen	21.4	20.7	19.6	18.5	17.9	gr. % Hb.
met Menformon behandelde pasgeborenen	20.4	20.8	21.1	20.5	20.0	gr. % Hb.

Bij een tweetal patiënten waren wij in de gelegenheid om na te gaan of de stimuleering der bloedvorming door follikelhormoon gepaard gaat met een verhooging van het L.Q.

De eerste was een pasgeborene met een rhachischisis posterior totalis. Toen het kind 24 uur oud was werd het in de kliniek op-genomen en werd het intramusculair ingespoten met 3×10.000 ME Menformon.

Het verloop der verschillende bloedbevindingen was als volgt:

Voor Menformon

	toediening 1e dag	Na Menformon toediening 2e dag	4e dag	5e dag
Hb. gr. %	22.6	19.9	20.6	22.9
Cholesterol mgr. %	86	94	125	140
Lecithine mgr. %	105	105	225	275
Bilirubine mgr. %	0.5	0.7	0.2	0.4
Reticulocyten ‰	23	20	36	42

Wij zien hier parallel gaan een toeneming van het L.Q. met een toeneming van het reticulocyten-getal en een stijging van het Hb-gehalte. (Op den 6en levensdag ontwikkelden zich bij dit kind verschijnselen van meningitis, waarna de observatie werd gestaakt.)

De tweede patient, waarbij wij dezelfde onderzoeken verrichtten, was een kind van een jaar oud, dat verpleegd werd wegens hydrocephalus na een purulente meningitis. De algemeene toestand was tamelijk slecht en er waren aanwijzingen, dat er één of meer afgekapselde hersenabscessen bestonden.

De waarden van de ons interesseerende bloedbestanddeelen waren voor en na de toediening van Menformon als volgt:

Voor Menformon Na Menformon toediening 2e dag 4e dag 6e dag

Hb. gr. %	9.3	9.0	9.8	10.2
Cholesterol mgr. %	190	198	220	238
Lecithine mgr. %	210	250	325	300
Reticulocyten	10	14	26	30

Ook hier zien wij de toeneming van het L.Q. gepaard gaande met een activeering van de beenmerg-functie.

Bij een derde reeks pasgeborenen hebben wij nagegaan hoe de remmende eigenschap van serum t.o.v. haemolyse door lysolecithine zich in de eerste levensdagen wijzigt.

Onderzocht werden sera van normale neonati, bereid van navelstrengbloed en van bloed van den 2en, 4en, 6en, 8en en 10en dag. Als vergelijkingsobject werd hiernaast steeds serum van denzelfden gezonden volwassene gebruikt.

Het lysolecithine werd verkregen uit normaal volwassenen-

serum, nadat dit gedurende 24 uur op lichaamstemperatuur verwarmd was.

Dit lysolecithine werd gebruikt in een concentratie $8 \times$ zoo sterk als die, welke nog complete haemolyse gaf in een 2 % erythrocyten-suspensie.

Het op remmend vermogen te onderzoeken serum werd steeds met physiologische zoutoplossing twintig maal verdund.

Evenals in onze eerder genoemde proeven over haemolyse-rekking door serum werd de hoeveelheid Hb. vrij gemaakt uit de toegevoegde erythrocyten, gemeten met behulp van de Pullfrich-photometer.

Gelijktijdig werd van alle sera het cholesterolgehalte bepaald.

Percentage haemolyse door lysolecithine in serum 1 : 20.

No.	navelstreng- bloed	2e dag	4e dag	6e dag	8e dag	10e dag
1.	94% (55)	50% (225)	65% (?)	70% (140)	19% (130)	
2.	92% (60)	100% (110)	50% (140)			0% (150)
3.	96% (50)	100% (90)		70% (130)		15% (135)
4.	92% (100)		100% (90)		23% (140)	4% (150)
5.	100% (25)		100% (70)		60% (90)	10% (130)
6.	100% (50)		100% (80)	84% (110)		30% (130)
7.	100% (80)	100% (96)	86% (110)		30% (140)	
8.	100% (60)		100% (90)	86% (110)		10% (140)
9.	100% (50)	100% (90)		60% (120)		15% (135)
10.	4% (230)	4% (230)	21% (194)	4% (180)	3% (180)	0% (193)
gem.						
van:	9 volw.	5 volw.	7 volw.	5 volw.	4 volw.	7 volw.

haemolyse bij serum verdunning 1:20.

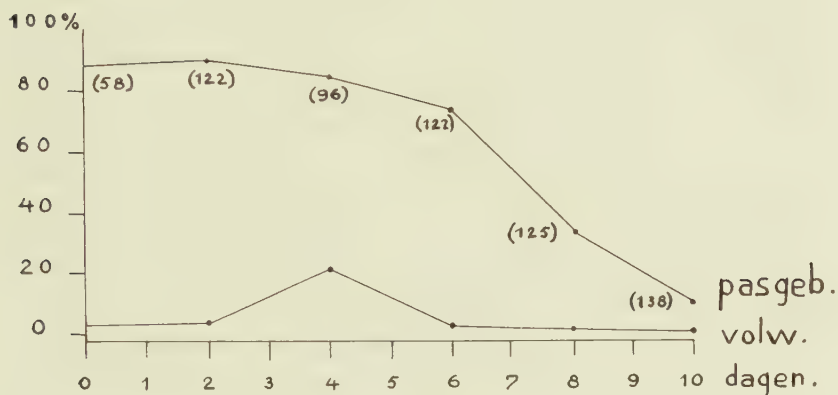


Fig. 8.

De aldus verkregen waarden voor de serum-remming, uitgedrukt door de percentages haemolyse, zijn in de nevenstaande tabel verzameld. Tusschen haakjes is onder deze percentages het totale cholesterol-gehalte van de onderzochte sera geplaatst.

De nummers 1 tot en met 9 betreffen de gegevens verkregen bij negen pasgeborenen, terwijl onder no. 10 is weergegeven het gemiddeld remmend vermogen van de als vergelijking gebruikte negen sera van denzelfden volwassene.

In de bijgevoegde fig. 8 is in beeld gebracht het gemiddeld haemolyse remmend vermogen van de negen pasgeborenen-sera op de onderzoek-dagen en dat van de volwassenen-sera als vergelijking. Tusschen haakjes staan de gemiddelde cholesterolgehalten op de onderzoek-dagen.

Wij zien dat, zooals reeds in het vorige hoofdstuk is aangetoond voor enkele gevallen, het serum bij de geboorte een geringe anti-haemolytische werking heeft en dat na den tweeden dag de remmende werking toeneemt met de stijging van het cholesterol-gehalte.

CONCLUSIES.

De theorieën over den icterus neonatorum, die de laatste jaren zijn verkondigd, nemen alle aan, dat de hyperbilirubinaemie van de neonatale periode zijn oorsprong vindt in een overmatig sterke bloedafbraak, althans in een bilirubinevorming, die per tijdseenheid grooter is dan in latere maanden.

Ook wij zijn de meening toegedaan, dat de afbraak van bloed-lichaampjes en dus van haemoglobine, in de eerste levensweek intensiever is dan later.

De opvatting, dat de verhooging van het galkleurstoffengehalte in het bloed enkel door onvoldoende leverfunctie zou ontstaan, dus van hepatogene oorsprong is, kan op grond van de uitkomsten der leverfunctieproeven bij pasgeborenen (broom sulfaleïn-test, bilirubine-belastingsproef) en ook om de groote bilirubine-excretie met de faeces als onjuist beschouwd worden.

Toch oefent de lever ongetwijfeld invloed uit op de graad der bilirubinaemie, in dien zin, dat de afvoer van het gevormde bilirubine afhankelijk is van de uitscheidings-capaciteit van de lever, waarbij wij echter een, blijkens den icterus, onvoldoende excretie niet moeten zien als een gevolg van een subnormale leverfunctie, maar veeleer als een gevolg van de wanverhouding tusschen het zeer groote bilirubine-aanbod en de maximale uitscheidings-capaciteit van een volwaardige lever.

De uiteindelijke oorzaak, de sterke bloedafbraak, heeft tot nu toe geen bevredigende verklaring gevonden. De opvatting, dat een verschil in bloedgroep tusschen moeder en kind, waarbij haemolysinen van de moeder via de placenta in het bloed van den neonatus overgaan en daar destructie van erythrocyten teweegbrengen, is niet houdbaar. De bloedafbraak treedt n.l. bij iederen neonatus op, geen enkele uitgezonderd, terwijl het niet mogelijk is, dat ieder kind een andere bloedgroep heeft dan de moeder. Dit geldt zoowel voor de groepen van het A.B.O.-systeem als ook voor de naderhand gevonden andere bloedfactoren M, N, P, en Rh.

De meest aangehangen zienswijze n.l. van Anselmino en Hoffman, die in het praenatale O₂-gebrek en de daarop volgende postnatale O₂-overvloed de oorzaak zien van de bloedafbraak na de geboorte, heeft eveneens eenige bezwaren (zie pag. 11), al zijn deze niet zoo zwaar wegend als die t.a.v. de andere theorieën. Toch voelen wij een onvolledigheid in deze theorie, omdat ze enkel aanduidt, dat de vermindering van circuleerend Hb. rationeel is, doch niet aangeeft langs welken weg deze vermindering plaats vindt.

In het onderstaande zullen wij onze zienswijze formuleeren, zooals deze uit de verkregen resultaten kan worden geconstrueerd. Wij zijn ons hierbij wel bewust, dat deze verklaring slechts betreft biochemische factoren en processen, welke de haemolysegraad bepalen; o.i. echter kan de grondgedachte van de theorie van Anselmino en Hoffman wel juist zijn, in dien zin, dat dit bloedafbraakproces van beteekenis is voor de aanpassing van den neonatus aan zijn nieuwe omgeving. Er van uitgaande, dat de physiologische bloedafbraak bij den neonatus plaats vindt door inwerking van lysolecithine op de erythrocyten, meenen wij aangetoond te hebben, dat het lysolecithine in het bloed van pasgeborenen in grooter hoeveelheid gevormd kan worden dan in volwassenenbloed. Deze grootere lysolecithine-vorming vindt zijn oorzaak in het lage cholesterol-gehalte en in het waarschijnlijk grootere lecithinase-gehalte van pasgeborenenbloed, terwijl ook het lecithinegehalte van invloed kan zijn. Bij gezonde pasgeborenen is dit laatste echter niet aan groote individueele schommelingen onderhevig (100—125 mgr. %). Indien echter een laag cholesterol-gehalte gepaard gaat met hooge lecithine-waarden kan de bloedafbraak, gemeten aan de bilirubinaemie van navelstrengbloed, excessief hoog zijn. Een enkele maal vonden wij dit in navelstrengbloed van gezonde neonati en tevens eenige keeren in navelstrengbloed van kinderen met icterus gravis neonatorum. In fig. 5, waar we het L.Q. afzetten tegen het bilirubine-gehalte vonden wij een duidelijker parallel tusschen deze waarden, dan wanneer wij slechts een verband uitzetten tusschen cholesterol en bilirubine (fig. 6).

Tijdens de eerste 7—10 dagen stijgt het cholesterol-gehalte van het bloed sterk, terwijl het lecithine-gehalte wel iets toeneemt, doch

in lang niet zoo sterke mate als het cholesterol. Het lysolecithine-vormend vermogen zal hierdoor geleidelijk afnemen na de eerste week en hiermee dus de bloedafbraak. Wellicht neemt gedurende de eerste levensweek ook het lecithinase-gehalte van het bloed af, doch hieromtrent ontbreken ons voldoende gegevens. Onze oriënteerende onderzoekingen over het lecithinase-gehalte hebben het waarschijnlijk gemaakt, dat in pasgeborenen-bloed dit ferment in grootere hoeveelheid voorkomt dan bij volwassenen; doch tevens dat de grootte der lysolecithine-vorming in de eerste plaats bepaald wordt door de hoeveelheid substraat en remmende stoffen.

Indien dit de enige factoren waren, die de bloedafbraak bij pasgeborenen bepalen, dan zouden wij hieruit besluiten, dat de bloedafbraak bij de geboorte het sterkst is en geleidelijk, met het toenemen van het cholesterol-gehalte, afneemt. De stijging van het galkleurstoffengehalte van het bloed gedurende de eerste levensweek zou dan zijn oorzaak vinden in een relatieve lever-insufficiëntie, m.a.w. de bilirubine-excretie door de placenta is grooter dan die door de lever. Het bleek ons echter, dat vóór de geboorte en gedurende de eerste dagen daarna nog een andere factor van belang is. Uit onze proeven over de invloed van follikelhormoon op de lysolecithine-vorming leidden wij af, dat dit hormoon een remmende invloed heeft op de lecithinesplitsing en dus de bloedafbraak kan tegen gaan. Het kind komt ter wereld met een zeer groote hoeveelheid follikelhormoon in het bloed, hetwelk tijdens de eerste 3-4 dagen vrijwel geheel wordt uitgescheiden, zoodat op den 4ten levensdag dikwijls geen follikelhormoon in de urine meer is aan te toonen. Indien inderdaad ook in vivo dit hormoon beteekenis heeft als bloedafbraak-remmende stof dan kunnen wij onze theorie aldus inkleeden: bij de geboorte bestaat een bloedafbraak van een sterkte, die bepaald wordt door het lipoïed-quotient, het follikelhormoon en het lecithinase; de bloedafbraak neemt de eerste dagen met het wegvallen van de follikelhormoon-werking toe, terwijl anderzijds het stijgende cholesterol-gehalte de bloedafbraak doet afnemen; na het volledig verdwijnen van het follikelhormoon wordt de bloedafbraak bepaald door het meer of minder snel stijgen van het cholesterol-gehalte.

Schematisch zouden wij dit aldus in beeld kunnen brengen:

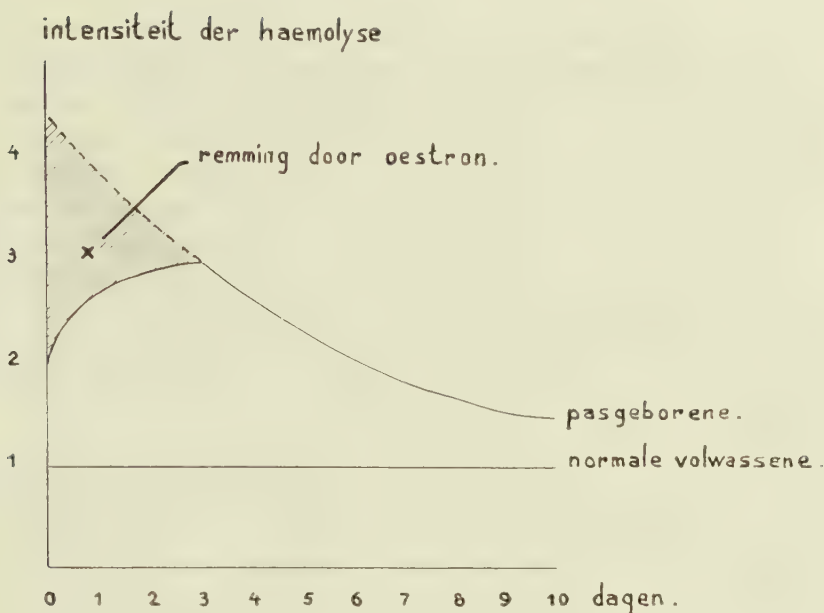


Fig. 9.

Bij ons onderzoek van een reeks van 30 pasgeborenen bleek een duidelijk verband te bestaan tusschen het cholesterol- en het bilirubinegehalte van het bloedserum gedurende de eerste tien levensdagen, terwijl tevens aangetoond kon worden, dat het bloedserum in deze dagen een, aanvankelijk geringe, remmende invloed had op de haemolyse door lysolecithine, welke remming in de volgende dagen vrijwel evenredig met het cholesterol-gehalte toenam.

Waarschijnlijk bestaan er variaties in de hoeveelheid follikelhormoon, die de pasgeborene meekrijgt bij de geboorte en evenzeer in de snelheid van uitscheiding van dit hormoon. Quantitatief is hierover echter vrijwel nog niets bekend.

De uitslag van onze onderzoekingen bij een klein aantal pasgeborenen, die gedurende den eersten dag driemaal daags een injectie van 10.000 E menformon ontvingen, toont aan, dat deze behandeling een vertragende invloed heeft op de stijging van de galkleurstoffenspiegel in het bloed; het merkwaardige echter is, dat bij enkelen naderhand toch een zichtbare icterus optrad ondanks het feit, dat de cholesterolspiegel als regel een belangrijke stijging vertoonde gedurende de observatie-periode en dikwijls lag boven

die van onbehandelde zuigelingen, die geen sterke hyperbilirubinaemie vertoonden. Wij meenen de oorzaak hiervan te moeten zoeken in de verschuiving van het lipoied-quotient naar hogere waarden onder invloed van follikelhormoon. Bij een neonatus en een ouder kind, waarbij wij, bij wijze van proef, eveneens gedurende één dag 3×10.000 E menformon inspotten, konden wij n.l. waarnemen, dat zoowel het gehalte aan lecithine als het cholesterol-gehalte toenam, doch in verhouding het lecithine in veel sterkere mate, waardoor dus het lipoied-quotient belangrijk hooger werd. Zooals wij te voren reeds hebben uiteengezet, zijn wij van meening, dat de verhouding der lipoïeden de meest belangrijke factor is, die de lyso-lecithine-vorming bepaalt.

Bij de neonati, die met menformon werden behandeld, heeft misschien het proces zich als volgt afgespeeld. Direct na de geboorte wordt de bloedaafbraak door de toediening van 30.000 E follikelhormoon niet sterker of misschien zelfs minder sterk, dan hij geweest is vóór de geboorte, terwijl het lipoied-quotient onder invloed van hetzelfde hormoon toeneemt. Aanvankelijk wegen deze tegengesteld werkende factoren (remming en bevordering) wellicht ongeveer tegen elkaar op, doch de remming door het follikelhormoon valt na eenige dagen weer weg, terwijl de terugkeer van het lipoied-quotient tot zijn normale waarden langzamer tot stand komt en de bloedaafbraak in deze periode dus grooter zal zijn dan normaal. Gedurende deze dagen van aanpassing is een toeneming der bilirubinaemie te verwachten met een kans op het optreden van een zichtbare icterus.

Aan het follikelhormoon kunnen nog eenige andere functies worden toegekend, die in verband staan met de bloedsamenstelling bij pasgeborenen. Het is bekend, dat het follikelhormoon een stimulerende invloed heeft op de celproliferatie van verschillende weefsels in het lichaam, b.v. in sterke mate op het epitheel van uterus en vagina (zie o.a. van Weering). Zelfs wordt aan dit hormoon door enkelen een beteeckenis toegekend bij het ontstaan van maligne tumoren. Ook andere weefsels ondervinden een dergelijke invloed. Zoo is aangetoond, dat follikelhormoon in matige doseering een stimulerende werking heeft op de erythropoëse en leucopoëse (Feuchtinger). Als ondersteuning van de levertherapie bij pernicieuse anaemie wordt door Varady het follikelhormoon aanbevolen.

Langs welken weg deze stimuleering van het beenmerg tot stand komt is niet bekend, doch in vrijwel alle gevallen, waarbij in het organisme snelle groei van weefsels bestaat, is tevens een relatief hoog lipoied-quotient aanwezig. Bij de pasgeborene merken wij iets dergelijks op. Hier vinden wij een snelle groei van alle weefsels, een sterke activiteit van de bloedbereidende organen naast een hoog lipoied-quotient.

De sterke activiteit van het beenmerg en andere haarden waar bloedlichaampjes worden gevormd, blijkt uit het hoge getal vitaalkleurbare erythrocyten, dikwijls zelfs zijn kernhoudende roode bloedcellen aanwezig, en uit de matige leucocytose met linksverschuiving, die bij alle pasgeborenen kan worden gevonden. En ook hier vinden wij, parallel met het verdwijnen van het follikelhormoon uit het organisme, een teruggang, tot zelfs vrijwel geheel verdwijnen, van deze activiteitsverschijnselen. Bij de serie neonati die met menformon werden behandeld hebben wij duidelijk kunnen waarnemen, dat de daling van het reticulocytengetal bij hen niet of aanzienlijk later optrad dan bij onbehandelde pasgeborenen. In veel gevallen zagen wij zelfs, dat tot het einde der observatieperiode een hoger percentage vitaalkleurbare erythrocyten bestond dan bij de geboorte aanwezig was.

Kort samengevat zouden wij onze theorie over de bloedafbraak bij pasgeborenen uiteindelijk zoo kunnen formuleeren:

Voor de geboorte wordt de bloedsamenstelling gereguleerd door het follikelhormoon op de volgende wijze:

- 1e. door het follikelhormoon bestaat in het organisme een overwegen van het lecithine boven het cholesterol; de gevolgen hiervan zijn tweeërlei, n.l.:
 - a. versterkte lysolecithine-vorming;
 - b. versterkte activiteit van de bloedvormende organen.
- 2e. het follikelhormoon remt de overmatige lysolecithine-vorming eenigszins.

Na de geboorte wijzigt de toestand zich als volgt:

Door het verdwijnen van het follikelhormoon zal de directe invloed hiervan, n.l. de verminderde remming der lysolecithine-vorming, het eerst merkbaar worden, met als gevolg een toeneming der bloedafbraak. De wijziging van het lipoied-quotient gaat langzamer in zijn werk, waardoor de lysolecithine-vorming nog eenigen tijd groot blijft; evenzoo blijft de activiteit van het beenmerg nog eenige

dagen langer merkbaar. In het begin van de aanpassingsperiode kunnen we dus verwachten, dat de galkleurstoffen-spiegel van het bloed een stijging ondergaat, met de mogelijkheid, dat bij een deel der pasgeborenen de waarden zoo hoog stijgen, dat een zichtbare icterus het gevolg is.

Behalve deze genoemde argumenten voor de beteekenis van het follikelhormoon voor de bloedaafbraak bij pasgeborenen, is er een aanwijzing, dat de natuur, na de geboorte, pogingen doet om de overgang zoo geleidelijk mogelijk te doen verloopen. De eerste voeding van den pasgeborene, het colostrum, is n.l. relatief rijk aan follikelhormoon, terwijl het darmepitheel direct na de geboorte waarschijnlijk in staat is om dit hormoon ook peroraal toegediend, ongewijzigd te resorbeeren.

Een tweede „corrigeerende” maatregel, die o.i. beteekenis kan hebben, ligt op een ander gebied. De foetus komt ter wereld bedekt met een laagje vernix caseosa, waarvan de samenstelling gemiddeld ongeveer is: 85 % cholesterol en water en zouten. Het lijkt ons zeer waarschijnlijk, dat dit cholesterol als bron kan dienen, vanwaaruit de neonatus via de huid snel zijn relatief cholesterol-tekort kan aanvullen.

SAMENVATTING.

Na een overzicht over de literatuur betreffende de bloedaafbraak bij pasgeborenen en een algemeene beschouwing over intravitale haemolyse wordt een verslag gegeven van eigen proefnemingen.

Uitgegaan werd van de theorie van Fåhræus, die beschreef hoe de intravitale bloedaafbraak bewerkt wordt door lysolecithine, een stof die in stagneerend bloed gevormd wordt uit lecithine, door fermentatieve afsplitsing van een molecuul onverzadigd vetzuur. Dit lysolecithine kan op eenvoudige wijze uit serum worden bereid en is tot in hooge verdunning in staat om in vitro erythrocyten te doen oplossen. Fåhræus kent aan de milt een belangrijke rol toe bij de vorming van lysolecithine, omdat in dit orgaan bloed gedurende eenige uren kan stagneeren en de mogelijkheid tot lysolecithinevorming daarmee gegeven is.

Wij hebben in vitro de proeven van Fåhræus herhaald en daarbij kunnen vaststellen dat:

- lysolecithine uit volwassenen-sera, na bebroeden, in vrijwel constante hoeveelheid gewonnen kan worden;

- lysolecithine onwerkzaam wordt door „vrij” cholesterol;

- haemolyse door lysolecithine geremd wordt door kleine hoeveelheden verdund serum, waarbij het cholesterol-gehalte van dit serum de belangrijkste factor voor deze remming is;

- de osmotische resistentie van erythrocyten, na contact der cellen met lysolecithine, geringer wordt.

Na deze oriënteerende onderzoekingen werden dezelfde proeven herhaald met bloed van pasgeborenen. Uit de verkregen resultaten bleek dat:

- uit navelstreng-serum, na bebroeden, een grootere hoeveelheid lysolecithine gewonnen kan worden dan uit volwassenen-serum;

- het lage cholesterol-gehalte van het navelstreng-bloed hiervoor aansprakelijk gesteld moet worden, terwijl de mogelijk-

heid werd geopperd dat de pasgeborenen misschien over een
hooger lecithinase-gehalte in het bloed beschikt;
oestron de lecithine-splitsing remt;
serum van een pasgeborene in minder sterke mate de lyso-
lecithine haemolyse remt dan volwassenen-serum.

Bij een aantal pasgeborenen werden serie-bepalingen uitgevoerd
van het Hb-, cholesterol- en bilirubine-gehalte gedurende de eerste
levensdagen. In navelstreng-bloed bleek een duidelijke parallel te
bestaan tusschen het lipoïed-concentratie ($\frac{\text{lecithine}}{\text{vrij cholesterol}}$) en het
bilirubine-gehalte. Dit verband bleef aantoonbaar bij bepalingen
op de 2e, 4e, 6e en 9e levensdag.

Bij een reeks pasgeborenen, waarbij op de eerste dag 30.000 E.
Menformon werd ingespoten, was dit verband tusschen de lipoïe-
den en het bilirubine niet meer terug te vinden, terwijl ook het
verloop van het bilirubine-gehalte afweek van dat van onbehande-
elde pasgeborenen.

Op grond van deze resultaten werd als verklaring der postnatale
bloedaafbraak de volgende theorie opgesteld:

Bij de geboorte bestaat een bloedaafbraak, waarvan de intensiteit
beheerscht wordt door het lecithinase-gehalte, de verhouding der
lipoïeden ($\frac{\text{lecithine}}{\text{vrij cholesterol}}$) en door het oestron. De uitscheiding van
het oestron in de eerste dagen doet de lysolecithine-vorming toe-
nemen, welke toeneming door het regelmatig stijgend cholesterol-
gehalte gecompenseerd kan worden. De verhouding tusschen de
oestron-uitscheiding en de snelheid waarmee het cholesterol-gehalte
stijgt, bepaalt de intensiteit der postnatale bloedaafbraak.

Het verdwijnen van het oestron uit het organisme heeft bij den
pasgeborene tevens beteekenis voor het afnemen der bloedaan-
maak, zooals aan de reeks met oestron behandelde neonati kon
worden aangetoond.

RESUMÉ.

Après un aperçu de la littérature concernant la déglobulisation chez les nouveau-nés et après une considération générale sur l'hémolyse intravitale un compte-rendu de nos propres expériences est donné.

Le point de départ fut la théorie de Fåhræus, qui a décrit comment la déglobulisation intravitale est opérée par la lysolécithine, matière formée de lécithine dans le sang stagnant par dissolution fermentative d'une molécule d'acide gras non saturé.

Cette lysolécithine peut être préparée à partir du sérum d'une manière simple et elle est, même dans une dilution forte, capable de faire dissoudre *in vitro* des érythrocytes.

Fåhræus attribue à la rate un rôle important dans la formation de la lysolécithine, parce que dans cet organe le sang peut stagner durant quelques heures et que par conséquent la lysolécithine a la possibilité de se former.

Nous avons refait *in vitro* les expériences de Fåhræus et nous avons pu constater:

- que lysolécithine de sérum adulte peut être obtenue en quantité à peu près constante après passage à l'étuve;

- que lysolécithine est inactivée par le cholestérol „libre”;

- que l'hémolyse par la lysolécithine est freinée par de petites quantités de sérum dilué; la teneur en cholestérol de ce sérum est le facteur principal de ce freinage;

- que la résistance osmotique des érythrocytes est diminuée après le contact des cellules avec la lysolecithine.

Après ces recherches d'orientation les mêmes expériences furent répétées avec du sang de nouveau-nés. D'après les résultats obtenus, il se trouva que du sérum du sang ombilical après passage à l'étuve on peut tirer une plus grande quantité de lysolécithine que du sérum adulte.

Que la basse teneur en cholestérol du sang ombilical doit être considéré comme responsable de ce phénomène, tandis que l'on a

exprimé la possibilité, que peut-être le nouveau-né dispose d'une plus grande teneur en lécithinase dans le sang;

que l'oestron freine la seission de la lécithine;

que le sérum d'un nouveau-né freine l'hémolyse lysolécithinique dans une mesure moins forte que le sérum d'adulte.

Chez un certain nombre de nouveau-nés furent effectuées des mesures en série de la teneur en Hb, cholestérol et bilirubine durant les premiers jours de la vie.

Dans le sang ombilical on a pu constater clairement le parallèle que existe entre la concentration en lipoïde, $\frac{\text{lécithine}}{\text{cholesterol libre}}$, d'une part et la teneur en bilirubine d'autre part.

Ce rapport pouvait toujours être démontré dans les mesures faites le 2e, 4e, 6e et 9e jour de la vie.

Dans une série de nouveau-nés, à qui le premier jour furent injectées 30.000 U. Menformon, ce rapport entre les lipoides et la bilirubine n'a plus pu être retrouvé: la courbe décrite par la teneur en bilirubine différait de celle des nouveau-nés, que l'on n'avait pas traités.

Partant de ces resultats la théorie suivante fut établie pour expliquer la déglobulisation postnatale: à la naissance il existe une déglobulisation dont l'intensité est déterminée par la teneur en lécithinase.

par le rapport des lipoides, $\frac{\text{lécithine}}{\text{cholesterol libre}}$, et par l'oestron.

L'excrétion de l'oestron durant les premiers jours augmente la formation de lysolécithine, augmentation qui peut être compensée par l'accroissement régulier de la teneur en cholestérol. La relation entre l'excrétion d'oestron et la vitesse avec laquelle monte la teneur en cholestérol détermine l'intensité de la déglobulisation postnatale.

Le disparition de l'oestron de l'organisme a également chez le nouveau-né une certaine signification pour la diminution de la régénération du sang, comme put être démontré au sujet de la série de nouveau-nés traités avec oestron.

SUMMARY.

After a survey of the literature concerning the hemolysis in new-born children and a general dissertation on intravital hemolysis an account is given of the experiments of the author.

The theory of Fåhræus, who described how intravital hemolysis is brought about by lysolecithin, a substance formed in stagnating blood from lecithin by the fermentative splitting off of one molecule of unsaturated fatty acid, is taken as a starting point.

This substance lysolecithin can be manufactured from serum in a simple way and is able up to high dilutions to solve erythrocytes in vitro.

Fåhræus ascribes an important part to the spleen in the formation of lysolecithin, as the blood can stagnate in this organ for a few hours, and the possibility for the formation of lysolecithin is thus given.

We have repeated the experiments of Fåhræus in vitro and have been able to determine that: lysolecithin can be made from adults' sera, after incubation, in nearly constant quantities;

lysolecithin loses its activity by the influence of free cholesterol;

hemolysis by lysolecithin is checked by small quantities of diluted serum, in which case the cholesterol-content of this serum is the most important inhibiting factor.

The osmotic resistance of erythrocytes is diminished after a contact of these cells with lysolecithin.

After this orientating research the same experiments were repeated with the blood of new-born children. From the results obtained, it appeared that:

from serum of the umbilical cord, after incubation, a greater quantity of lysolecithin can be made than from adults serum;

the small cholesterol content of the cord-blood must be held responsible for this fact, while the possibility was suggested that the new-born child may have a greater lecithinase-content in the blood;

estron checks the splitting of lecithin; serum of a new-born child inhibits the lysolecithinic hemolysis to a less extent than adults' serum does.

In a number of new-born children serial determinations were carried out of the hemoglobin-content, cholesterol-content and bilirubin-content during the first days of life.

In the blood of the umbilical cord there appeared to run an obvious parallel between the lipoid-concentration $\frac{\text{lecithin}}{\text{free cholesterol}}$ and the bilirubin-content.

This connection remained demonstrable on the 2nd, 4th, 6th and 9th day of life.

In a series of new-born children, injected with 30.000 U. Menformon on the first day, this connection between the lipoids and the bilirubin could not be found again, while also the course of the bilirubin-content deviated from that of new-born children not having undergone treatment.

On the ground of these results the following theory was framed as an explanation of the postnatal hemolysis.

At birth a hemolysis exists, of which the intensity is dominated by the lecithinase-content, the proportion of the lipoids, $\frac{\text{lecithin}}{\text{free cholesterol}}$ and by the estron.

The excretion of the estron during the first days increases the formation of lysolecithin, which increase can be compensated by the regularly rising cholesterol-content. The proportion between the excretion of the estron and the rapidity of the rising of the cholesterol-content, determine the intensity of the postnatal hemolysis.

The disappearance of the oestron from the organism is also important in new-born children for the decrease of hematopoietic activity, as was shown in the series of new-born children treated with estron.

ZUSAMMENFASSUNG.

Nach einer Literaturübersicht über Blutzerfall bei Neugeborenen und einer allgemeinen Besprechung der intravitalen Hämolyse werden eigene Untersuchungen beschrieben.

Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Theorie von Fähræus. In dieser Theorie wird der intravitale Blutzerfall dem Lysolezithin zugeschrieben, einem Stoff, der durch fermentative Abspaltung einer Molekuls ungesättigter Fettsäure aus dem Lecithin im stillstehenden Blut entsteht. Dieses Lysolezithin kann in einfacher Weise aus dem Serum bereitet werden und ist im Stande auch noch in starker Verdünnung Erythrozyten aufzulösen.

Fähræus schreibt der Milz eine wichtige Rolle bei der Lysolezithinbildung zu, weil in diesem Organ Blut stundenlang stagnieren kann, wodurch die Möglichkeit zur Lysolezithinbildung vorhanden ist.

Wir haben in vitro die Untersuchungen von Fähræus wiederholt und folgende Feststellungen machen können:

1. Lysolezithin wird aus Serum Erwachsener im Brutschrank in fast konstanter Menge gewonnen.
2. Lysolezithin wird durch freies Cholesterol unwirksam.
3. Die Lysolezithinhämolyse wird durch kleine Mengen verdünnten Serums gehemmt; auch hierbei ist der Cholesterolgehalt des Serums die wichtigste hemmende Faktor.
4. Der osmotische Widerstand der Erythrozyten wird durch kontakt dieser Zellen mit Lysolezithin geringer.

Nach diesen orientierenden Untersuchungen wurden dieselben Experimente mit Neugeborenenblut wiederholt.

Die Resultate ergaben:

1. Aus Nabelschnurserum kann in Brutschrank eine grössere Menge Lysolezithin als aus Erwachsenenserum gewonnen werden.

2. Der niedrigere Cholesterolgehalt des Nabelschnurblutes kann hierfür verantwortlich sein. Dabei wird für möglich gehalten dasz die Neugeborenen auch noch über einen höheren Lezithinasegehalt im Blut verfügen.

3. Oestron hemmt die Lezithinspaltung.

4. Neugeborenenserum hemmt die Lysolezithinhämolyse in geringerem Masze als Erwachsenenserum.

Bei einer Anzahl Neugeborener wurden Serien Bestimmungen vom Hb-, Cholesterol- und Bilirubingehalt in den ersten Lebenstagen durchgeführt.

Im Nabelschnurblut bestand eine deutliche Parallele zwischen der Lipöidkonzentration, $\frac{\text{Lezithin}}{\text{freies Cholesterol}}$, und dem Bilirubin-gehalt. Diese Beziehung blieb bei Bestimmungen am 2., 4., 6. und 9. Lebenstage nachweisbar.

Bei einer Gruppe Neugeborener, bei der am ersten Tage 30.000 E. Menformon injiziert wurden, war diese Beziehung zwischen Lipoïden und Bilirubin nicht mehr nachweisbar. Auch der Verlauf des Bilirubingehaltes wich von dem Unbehandelter Neugeborener ab.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde für die Erklärung des postnatalen Blutzerfalls folgende Theorie aufgestellt.

Die Intensität des Blutzerfalls bei der Geburt wird durch den Lezithinasegehalt, durch das Verhältnis der Lipoïde,

Lezithin

—, und das Oestron beherrscht. Durch die Oestron-freies Cholesterol ausscheidung der ersten Tage nimmt die Lysolezithinbildung zu, die jedoch durch den regelmäszig steigendem Cholesterolgehalt kompensiert werden kann. Das Verhältnis zwischen Oestronaus-scheidung und Geschwindigkeit des Cholesterolanstiegs bestimmt die Intensät des postnatalen Blutzerfalls.

Das Verschwinden des Oestrone aus dem Organismus hat beim Neugeborenen auch Bedeutung bei der Abnahme der Bluthildung. An der Gruppe Neugeborener, die mit Oestron behandelt wurden, konnte dieses nachgewiesen werden.

LITERATUUR.

- Anselmino, K. J. en Hoffmann, F.: Arch. f. Gynäk. 143. 477, 1931.
Bergenheim, B. en Fåhræus, R.: Zeitschr. f. d. ges. exper. Med.
555, 97, 1936.
Berglund: Blodreservoirerna och Blodstabiliteten. Hygiea 1930.
(citaat Vandenbroucke).
Bogaert, R.: J. of Physiol. 90, 1937.
Brinkman, R.: Arch. Neerland. de Physiologie de l'homme et des
animaux, VI, 5, 1922.
Biochem. Zeitschrift, 103, 1920.
Broman, B.: Acta Paediatrica 31, Suppl. II, 1944.
Büngler, W. en Schwartz, P.: Münch. Med. Woch. 74, 1822, 1927.
Chamberlain, E. N.: Brit. Med. J. 2, 896, 1929.
Chatterjee, H. N.: Lancet 14, I, 1940.
Creveld, S. van: Am. J. Dis. of Childr. 30, 240, 1925.
Cserna, S. en Liebmann, S.: Klin. Woch. 2, 2122, 1923.
Dameshek, W. en Schwartz, S. O.: Am. J. Med. Sc. 196, 769, 1938.
Debré en Hamburger: C. R. Soc. Biol. 154, 97, 1927.
Degkwitz, R.: Lipoide und Ione, Wissenschaftl. Forsch. Berichte,
Bd. 31.
Delezenne en Ledebt: C. R. Acad. de Sc. Paris. 152, 790, 1911.
Escobar en Baldwin: Am. J. Physiol. 107, 249, 1934.
Faxen, N.: Acta Paed. 19, Suppl. I. 1937.
Feuchtinger, O.: Zeitschr. f. Klin. Med. 288 en 697, 141, 1941.
Gawrilow: Virch. Arch. 269, 1928.
Giannini, O.: Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 64, 431, 1929.
Goldbloom, A. en Gottlieb, R.: Am. J. Dis. of Childr. 38, 57, 1929.
Journ. of Clin. Invest. 8, 375, 1929.
Gordon en Kleinberg: Proc. Soc. Exper. Biol. and. Med. 37, 507,
1937/38.
Gripwall, E.: Acta Med. Scand., 1938, Suppl. 96, 1.
Györgi, P.: Klin. Woch. 3, 483, 1924.

- Hampson: Guy's Hospit. Reports, 78, 198, 1928.
- Haselhorst, G. en Stromberger, K.: Zeitschr. f. Geb. und Gynäk. 98, 49, 1930.
- Herlitz, P.: Acta Paed. 6, 214, 1926/27.
- Hirsch, A.: Zeitschr. f. Kinderh. 9, 196, 1913.
- Hornung, R.: Klin. Woch. 4, 475, 1925.
- Jonxis, J. H. P.: Maandschr. v. Kindergen. 5, 363, 1936.
- Josephs, H. W.: Johns Hopk. Hosp. Bull. 62, 70, 1938.
Medecine 15, 307, 1936.
- Kato, K.: Folia haematol. 46, 377, 1932.
- Klein, J. en Stone, F. M.: Journ. of Bact. 22, 387, 1931.
- Kofler en Schrutka: Biochem. Zeitschr. 159, 327, 1925.
- Kramann en Hoffman: Arch. f. Gynäk. 169, 646—647.
- Lenart, P.: Jahrb. f. Kinderh. 121, 134, 1928.
- Linn, H. en Eastman, N. J.: Am. J. Obstetr. 33, 317, 1937.
- Lucas, W. S. en Dearing, B. F.: Am. J. Dis. of Childr. 21, 96, 1921.
- Lippmann, H. S.: Am. J. Dis. of Childr. 27, 473, 1924.
- Lintzell en Radeff: Arch. f. d. ges. Physiol. 222, 674, 1929.
- Muller, L.: Am. J. Med. Sc., 179, 316, 1930.
- Malloy, H. T. en Evelyn, K. A.: J. Biol. Chem. 119, 481, 1937.
- Martinet, P.: Gynéc. et Obstétr. 35, 365, 1937.
- Muller, L.: Am. J. Med. Sc. 179, 316, 1930.
- Nattan en Larrier: C. R. Soc. Biol. 97, 2, 673, 1927.
- Polano, M. K.: Diss. Leiden, Med. 1934/35 No. 2.
- Ponder, E.: Protoplasma-monographien VI, Berlin. 1934.
- Rasi, F. en Bianchi, O.: Schw. Med. Woch. 1941, II, 1253.
- Ransom: Deut. Med. Woch. 27, 1901.
- Robinow, M. en Hamilton, W. F.: Am. J. Dis. of Childr.
60, 827, 1940.
- Ross, S. G., Waugh, T. R. en Malloy, H. T.: J. of Pediatr.
11, 397, 1937.
- Rossum, P. van: C. R. Soc. Biol. Belge, 132, 475, 1939.
- Singer, K.: Am. J. Med. Sc. 199, 466, 1940.
Am. J. Clin. Invest. 20, 153, 1945.
- Snoo, K. de: Ned. Tijd. v. Gen. 1941, 3965.
Ned. Tijd. v. Verlosk. en Gyn. 44, 147, 1941.
- Schiødt: Acta Med. Scand. 95, 49, 1938.
- Vahlquist, B.: Acta Paed. Suppl. V, 1941.
- Vandenbroucke, J.: Proefschrift Leuven 1944.

- Waugh, T. R., Merchant, F. T. en Maughan, G. B.: Am. J. Med.
Sc. 199, 9, 1940.
- Ylppö, A.: Zeitschr. f. Kinderh. 9, 208, 1913.
- Weering, J. van: Diss. Groningen, Med. 1933.

